



การยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อ *Ganoderma orbifome*
เพื่อพัฒนาแนวทางการควบคุมโรคลำต้นเน่าในปาล์มน้ำมัน

Inhibition of Ligninolytic Enzyme Activity of *Ganoderma orbifome* for Developing
a Control Guideline to Basal Stem Rot Disease in Oil Palm

ศรัณยา อินทรอนันต์
Saranya Intara-anun

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Plant Pathology
Prince of Songkla University

2567

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



การยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อ *Ganoderma orbifome*
เพื่อพัฒนาแนวทางการควบคุมโรคลำต้นเน่าในปาล์มน้ำมัน
Inhibition of Ligninolytic Enzyme Activity of *Ganoderma orbifome* for Developing
a Control Guideline to Basal Stem Rot Disease in Oil Palm

ศรัณยา อินทรอนันต์
Saranya Intara-anun

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Plant Pathology
Prince of Songkla University
2567
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชัชวาทานิชพนธ์ การยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อ *Ganoderma orbifor* เพื่อพัฒนาแนวทางการควบคุมโรคลำต้นเน่าในปาล์มน้ำมัน

ผู้เขียน นางสาวศรัณยา อินทรอนันต์

สาขาวิชา โรคพืชวิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ



Digitally signed: 2024.05.28 11:23:25 +07:00

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฉันทชนก ไชยรินทร์)

อินันท์ พรธรียา

..ประธาน

Digitally signed: 2024.05.28 11:25:41 +07:00

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนิพันธ์ พรสุริยา)

ស្រុក ត្បូងឃ្មុំ

.กิจกรรมการ

Digitally signed : 2024.05.29 9:39:35 +07:00

(รองศาสตราจารย์ ดร.อนุรักษ์ สันป่าเป้า)



.กิจกรรมการ

Digitally signed : 2024.05.28 11:23:27 +07:00

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฉันทวิชฌ์ ไชยรินทร์)

.....

.กิจกรรมการ

Digitally signed : 2024.06.05 9:38:30 +07:00

(ดร.อมิรดี เสี่ยงสืบชาติ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาโรคพืชวิทยา



Digitally signed: 2024.06.07 13:40:52 +07:00

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กวินพัฒน์ สิริกานติโสภณ)

รักษาการแทนคณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณ
บุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....

Digitally signed : 2024.05.28 11:23:28 +07:00

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธัญชนก ไชยรินทร์)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ.....ศรัณยา.....

นางสาวศรัณยา อินทรอนันต์

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน
และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....ศรัณยา.....

นางสาวศรัณยา อินทรอนันต์

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ การยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อ *Ganoderma orbiforme* เพื่อพัฒนาแนวทางควบคุมโรคลำต้นเน่าในปาล์มน้ำมัน

ผู้เขียน นางสาวศรัณยา อินทรอนันต์

สาขาวิชา โรคพืชวิทยา

ปีการศึกษา 2566

บทคัดย่อ

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย หนึ่งในปัญหาที่ส่งผลกระทบต่อการผลิตปาล์มน้ำมัน คือโรคลำต้นเน่า (basal stem rot disease) สาเหตุจากเชื้อ *Ganoderma orbiforme* (syn. *G. boninense*) โดยเชื้อนี้สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินที่เป็นส่วนประกอบหนึ่งของผนังเซลล์พืชเพื่อเข้าทำลายภายในพืชอาศัย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่ออธิบายปัจจัยทางกายภาพ เคมี และชีวภาพที่ส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน ได้แก่ แลคเคส ลิกนินเปอร์ออกซิเดส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่เชื้อ *G. orbiforme* ผลิตขึ้นในสภาพห้องปฏิบัติการ และเพื่อให้ได้ข้อมูลในการจัดการปัจจัยทางกายภาพ เคมี และชีวภาพไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมโรคลำต้นเน่าในปาล์มน้ำมัน งานวิจัยในครั้งนี้แบ่งการศึกษาเป็น 3 หัวข้อคือ (1.) หาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *G. orbiforme* K4/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง โดยผลการทดลองพบว่าวัสดุที่เหมาะสมคือ ใบปาล์มน้ำมันในอัตราส่วน 1:8 บ่มที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 8 วัน และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการสกัดหยาบเอนไซม์คือ acetate buffer pH 5.0 (2.) ทดสอบปัจจัยทางกายภาพ เคมี และชีวภาพที่สามารถยับยั้งการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อ *G. orbiforme* K4/2 ซึ่งพบว่าการเลี้ยงเชื้อในที่มืดที่มีดสลับแสง LED และภายใต้แสงสีฟ้า การเลี้ยงเชื้อที่ pH 5.0, 6.0, 8.0 และ 9.0 การเติมธาตุอาหารเช่น Br, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, N, P และ Zn การเติมสารประกอบฟีนอลิก เช่น azure B, guaiacol, phenol (ความเข้มข้น 10–30 mM) และ salicylic acid (ความเข้มข้น 20–30 mM) การเติมกรดอินทรีย์เช่น acetic acid (ความเข้มข้น 20–80 mM), citric acid (ความเข้มข้น 20, 60 และ 80 mM) และ lactic acid (ความเข้มข้น 20, 40 และ 80 mM) การเติม CaCO₃ (ความเข้มข้น 10–20%) และเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. (*Trichoderma* sp. Z2-02, *Trichoderma* sp. Trg3-8, *T. asperellum* K1-02 และ *T. asperellum* T76-14) สามารถยับยั้งการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินได้ และ (3.) ทดสอบปัจจัยที่สามารถยับยั้งค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน ผลการทดสอบพบว่าการบ่มที่อุณหภูมิ 60–70 °C การบ่มในที่มืด ในที่มีดสลับแสง LED การเติมธาตุอาหาร

เช่น Br, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, N และ P การเติมสารประกอบฟีนอลิกเช่น guaiacol และ salicylic acid (ความเข้มข้น 10–30 mM) และกรดอินทรีย์เช่น acetic acid, citric acid และ lactic acid (ความเข้มข้น 20–80 mM) สามารถยับยั้งค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลิกนิน ซึ่งข้อมูลที่ได้ในการศึกษานี้สามารถนำไปจัดทำเป็นคู่มือการควบคุมโรคลำต้นเน่าในปาล์มน้ำมันได้

Thesis title Inhibition of Ligninolytic Enzyme Activities of *Ganoderma orbiforme* for Developing a Control Guideline to Basal Stem Rot Disease in Oil Palm

Author Saranya Intara-anun

Major Program Plant Pathology

Academic Year 2023

ABSTRACT

Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) is an important economic crop in Thailand. One of the problems affecting palm oil production is basal stem rot disease caused by *Ganoderma orbiforme* (syn. *G. boninense*). This pathogenic fungus can produce enzymes to degrade lignin, a component of plant cell walls called lignin-degrading enzymes before infection to the host plant. Therefore, this research aims to explain the physical, chemical, and biological factors that affect the activity of lignin-degrading enzymes of *G. orbiforme* including laccase, lignin peroxidase, and manganese peroxidase under laboratory conditions, and to obtain information for applying physical, chemical, and biological factors to control basal stem rot disease in oil palm. This research was divided into 3 topics; (1.) Condition optimization for enzyme production by *G. orbiforme* K4/2 under solid-state cultivation. The results found that the optimal solid substrate was oil palm leaves at a solid: liquid ratio of 1:8, incubated at 28 °C for 8 days, and the buffer used for crude enzyme extraction was acetate buffer pH 5.0. (2.) Evaluation of physical, chemical, and biological factors that inhibited the production of lignin-degrading enzymes of *G. orbiforme* K4/2. It was found that incubation in the dark, the dark alternating with LED light and under blue light, pH 5.0, 6.0, 8.0 and 9.0, addition of nutrients such as Br, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, N, P and Zn, phenolic compounds such as azure B, guaiacol, phenol (concentration of 10–30 mM) and salicylic acid (concentration of 20–30 mM), organic acids such as acetic acid (concentration of 20–80 mM), citric acid (concentration of 20, 60 and 80 mM) and lactic acid (concentrations of 20, 40, and 80 mM) and CaCO₃ (concentration of 10–20%), and the used of *Trichoderma* spp. (*Trichoderma* sp. Z2-02, *Trichoderma* sp. Trg3-8, *T. asperellum* K1-02 and *T. asperellum*

T76-14) could inhibit the lignin-degrading enzyme production by *G. orboforme* K4/2. (3.) Evaluation of factors that inhibited the activity of lignin-degrading enzymes. The results showed that incubation at temperatures of 60–70 °C, in the dark and the dark alternating LED light, addition of nutrients such as Br, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, N and P, phenolic compounds such as guaiacol and salicylic acid (concentration 10–30 mM) and organic acids such as acetic acid, citric acid, and lactic acid (concentrations of 20–80 mM) inhibited activities of lignin-degrading enzyme of *G. orboforme* K4/2. The information from this study could be used to develop a manual for controlling basal stem rot disease in oil palm.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธัญชนก ไชยรินทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่มอบความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษาในการทำวิจัยครั้งนี้ ทั้งชี้ให้เห็นแนวทางในการแก้ปัญหา และเป็นผู้แก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ ส่งผลให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วง

ขอขอบพระคุณประธานกรรมการการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชนินันท์ พรสุริยา และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. อนุรักษ์ สันป่าเป้า และ ดร. อภิรดี เสี่ยงสืบชาติ ที่กรุณาให้คำแนะนำ และชี้ให้เห็นข้อบกพร่องในวิทยานิพนธ์นี้ เพื่อให้นำไปแก้ไขได้อย่างถูกต้อง และสำเร็จไปด้วยดี

งานวิจัยนี้ได้รับทุนการสนับสนุนจากศูนย์วิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ ระยะที่ 3 คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการโรคพืชวิทยา วิชาเอกการจัดการศัตรูพืช สาขาเกษตรกรรม การเกษตรและการจัดการ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่อำนวยความสะดวกในการทำวิจัยในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณพ่อแม่ และครอบครัวที่คอยเป็นกำลังใจ และคอยผลักดันในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ ทั้งนี้ก็ขอขอบคุณ พี่ ๆ และเพื่อน ๆ ที่ศึกษาปริญญาโททุกคนที่คอยช่วยเหลือ และคอยให้กำลังใจในการทำงานวิจัยในครั้งนี้

ศรัณยา อินทรอนันต์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
ABSTRACT	(7)
กิตติกรรมประกาศ	(9)
สารบัญ	(10)
รายการตาราง	(11)
รายการภาพ	(12)
บทที่ 1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
บทที่ 2 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
วัตถุประสงค์	14
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	15
บทที่ 4 ผลการทดลอง และวิจารณ์ผล	26
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	63
บรรณานุกรม	64
ประวัติผู้เขียน	78

รายงานตาราง

ตารางที่		หน้าที่
1.	ความเข้มข้นของธาตุอาหารในทางใบที่ 17 ของปาล์มน้ำมัน ที่อายุน้อยกว่า 6 ปี และในปาล์มน้ำมันที่มีอายุมากกว่า 6 ปี	12
2.	ผลของธาตุอาหารต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อรา <i>Ganoderma orbiforme</i> K4/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง	40
3.	ผลของสารประกอบฟีนอลิกต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อรา <i>Ganoderma orbiforme</i> K4/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง	43
4.	ผลของกรดอินทรีย์ต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อรา <i>Ganoderma orbiforme</i> K4/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง	45
5.	ผลของธาตุอาหารที่ต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อรา <i>Ganoderma orbiforme</i> K4/2	55
6.	ผลของสารประกอบฟีนอลิกต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อรา <i>Ganoderma orbiforme</i> K4/2	57
7.	ผลของกรดอินทรีย์ต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อรา <i>Ganoderma orbiforme</i> K4/2	59
8.	ผลของปัจจัยทางกายภาพ เคมี และชีวภาพต่อเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน	60

รายการภาพ

ภาพที่	หน้าที่
1. องค์ประกอบของผนังเซลล์พืช	3
2. โครงสร้างของเซลล์โลส	4
3. โครงสร้างของเฮมิเซลล์โลส	5
4. โครงสร้างของลิกนิน	6
5. ลักษณะอาการของโรคลำต้นเน่า	7
6. ดอกเห็ดที่เกิดจากเชื้อ <i>Ganoderma boninense</i>	8
7. การทดสอบกลไกการแก่งแย่งแข่งขันระหว่างเชื้อ <i>Trichoderma</i> spp. ต่อเชื้อ <i>Ganoderma orbiforme</i> K4/2 ด้วยวิธี dual culture	21
8. การทดสอบการสร้างสารระเหยของเชื้อ <i>Trichoderma</i> spp. ต่อเชื้อ <i>Ganoderma orbiforme</i> K4/2 ด้วยวิธี sealed plate	22
9. การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเชื้อเลี้ยง <i>Trichoderma</i> spp. ต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อ <i>Ganoderma orbiforme</i> K4/2	23
10. วัสดุเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อรา <i>Ganoderma orbiforme</i> K4/2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง	27
11. อัตราส่วนระหว่างของแข็ง/ของเหลวที่เหมาะสมบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อรา <i>Ganoderma orbiforme</i> K4/2	29
12. อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อรา <i>Ganoderma orbiforme</i> K4/2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง	31
13. ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อรา <i>Ganoderma orbiforme</i> K4/2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง	32
14. บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการสกัดหยาบเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินที่เชื้อรา <i>Ganoderma orbiforme</i> K4/2 ผลิตขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง	34

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้าที่
15.	ความเป็นกรด-ด่างของของเหลวต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินที่เชื้อรา <i>Ganoderma orbiforme</i> K4/2 ผลิตขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง	36
16.	การเลี้ยงเชื้อภายใต้แสงต่าง ๆ ต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อรา <i>Ganoderma orbiforme</i> K4/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง	38
17.	ความเข้มข้นของ CaCO_3 ต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อรา <i>Ganoderma orbiforme</i> K4/2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง	47
18.	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเชื้อ <i>Trichoderma</i> spp. ต่อเชื้อรา <i>Ganoderma orbiforme</i> K4/2 ด้วยวิธี dual culture	48
19.	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเชื้อ <i>Trichoderma</i> spp. ต่อเชื้อรา <i>Ganoderma orbiforme</i> K4/2 ด้วยวิธี sealed plate	49
20.	ผลของน้ำเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายของเชื้อรา <i>Ganoderma orbiforme</i> K4/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง	50
21.	อุณหภูมิที่ส่งผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อรา <i>Ganoderma orbiforme</i> K4/2	51
22.	ระยะเวลาที่ส่งผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อรา <i>Ganoderma orbiforme</i> K4/2	52
23.	แสงที่ส่งผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อรา <i>Ganoderma orbiforme</i> K4/2	53

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ น้ำมันปาล์มซึ่งสกัดได้จากปาล์มน้ำมันถูกนำไปใช้กันแพร่หลายทั่วโลก และมีการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น อาหาร ยา เครื่องสำอาง ไบโอดีเซล และในอุตสาหกรรมโอเลโอเคมี (Muniroh *et al.*, 2019) จากข้อมูลในปี 2565 ประเทศไทยผลิตปาล์มน้ำมันเป็นอันดับ 3 ของโลกรองจากอินโดนีเซีย และมาเลเซีย (ชัยวัฒน์ โชตเจริญสุข, 2566) ซึ่งพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันส่วนใหญ่ของประเทศไทยอยู่ทางภาคใต้โดยพบว่ามีผลผลิตประมาณ 16.76 ล้านตัน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2565) หนึ่งในปัญหาสำคัญของการผลิตปาล์มน้ำมันในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ คือโรคลำต้นเน่า (basal stem rot) (Ho and Nawawi, 1985; Hushiarian *et al.*, 2013) ซึ่งเป็นโรคที่สร้างความเสียหายอย่างรุนแรงแก่ปาล์มน้ำมัน ทำให้ผลผลิตลดลงหรือไม่ให้ผลผลิตเลย (Singh, 1991) ส่วนใหญ่มักพบโรคนี้ในปาล์มน้ำมันที่มีอายุมากกว่า 25 ปี (Turner, 1981) โดยในปี พ.ศ. 2500 มีรายงานว่าพบโรคมากขึ้นในปาล์มน้ำมันอายุ 10–15 ปี และในปี พ.ศ. 2534 มีรายงานว่าพบโรคหลังปลูกปาล์มน้ำมันเป็นเวลา 1–2 ปี และพบโรคดังกล่าวในปาล์มน้ำมันมากขึ้นเรื่อย ๆ โรคนี้เกิดจากเชื้อรา *Ganoderma boninense* (Yu and Chong, 2018) ซึ่งชื่อปัจจุบันคือ *G. orbiforme* (<https://www.mycobank>) โดยเชื้อรา *G. orbiforme* สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน (lignin-degrading enzyme) ซึ่งเป็นส่วนประกอบหนึ่งของผนังเซลล์พืช ได้แก่ เอนไซม์แลคเคส (laccase) ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (lignin peroxidase) และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (manganese peroxidase) (Dias *et al.*, 2010) เพื่อทำลายความแข็งแรงของผนังเซลล์พืช จากนั้นเชื้อรา *G. orbiforme* จึงสร้างเส้นใยเจริญภายในของต้นปาล์มน้ำมันทำให้รบกวนการดูดซึมน้ำและสารอาหารไปยังส่วนอื่น ๆ ของต้นปาล์ม (Goh *et al.*, 2016) ส่งผลให้ใบเหลือง ใบยอดไหม้คล้ำ ทางใบล่างหักพับทิ้งตัวลง และเกิดดอกเห็ด (basidiocarps) บริเวณลำต้นส่วนล่างของปาล์มน้ำมัน ทำให้ผลผลิตของปาล์มน้ำมันลดลง และปาล์มน้ำมันยืนต้นตายในที่สุด (Ho and Tan, 2015)

การควบคุมโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันด้วยวิธีเขตกรรม และวิธีกลไม่มีประสิทธิภาพมากพอในการควบคุม เนื่องจากเชื้อ *G. boninense* เป็นเชื้อที่อาศัยอยู่ในดิน (soil-borne) มีระยะพักในรูป melanised mycelium, basidiospore และ pseudosclerotia และการสังเกตการเกิดโรคทำได้ยากในระยะเริ่มแรกของการเข้าทำลาย เนื่องจากไม่แสดงอาการภายนอก (Susanto *et al.*, 2005) สำหรับการให้สารเคมีสามารถควบคุมเชื้อ *G. orbiforme* ได้ แต่กลับมีต้นทุนที่สูง มีความเสี่ยงด้านสุขภาพ และส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม (Shariffah-Muzaimah *et al.*, 2015) การหาแนวทางเพื่อควบคุมหรือยับยั้งเชื้อ *G. orbiforme* ด้วยวิธีอื่นนอกเหนือจากการใช้สารเคมีจึงน่าจะเป็นทางเลือกที่ปลอดภัยสำหรับเกษตรกร ซึ่ง Isroi และคณะ (2011) รายงานว่า ความชื้น แสง อุณหภูมิ อนุภาคของดิน และค่าความเป็นกรด-ด่างของดิน ส่งผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน นอกจากนี้ Kresnawaty และคณะ (2018) พบว่าองค์ประกอบของสารอาหาร สารประกอบฟีนอลิก และปัจจัยทางชีวภาพ เช่น เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. (วาริน อินทนา และ อรรถกร พรหมวี, 2559) มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินเช่นเดียวกัน กล่าวได้ว่าหากสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินจะส่งผลให้เชื้อ *G. orbiforme* ไม่สามารถเข้าทำลายต้นปาล์มน้ำมันได้ ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แลคเคส ลิกนินเปอร็อกซิเดส และแมงกานีสเปอร็อกซิเดสที่เชื้อรา *G. orbiforme* ผลิตขึ้นในสภาพห้องปฏิบัติการ โดยการทดสอบปัจจัยทางกายภาพ เคมี และชีวภาพที่ส่งผลต่อเชื้อรา *G. orbiforme* เพื่อใช้เป็นแนวทางสำหรับการควบคุมโรคลำต้นเน่าในปาล์มน้ำมันต่อไป

บทที่ 2

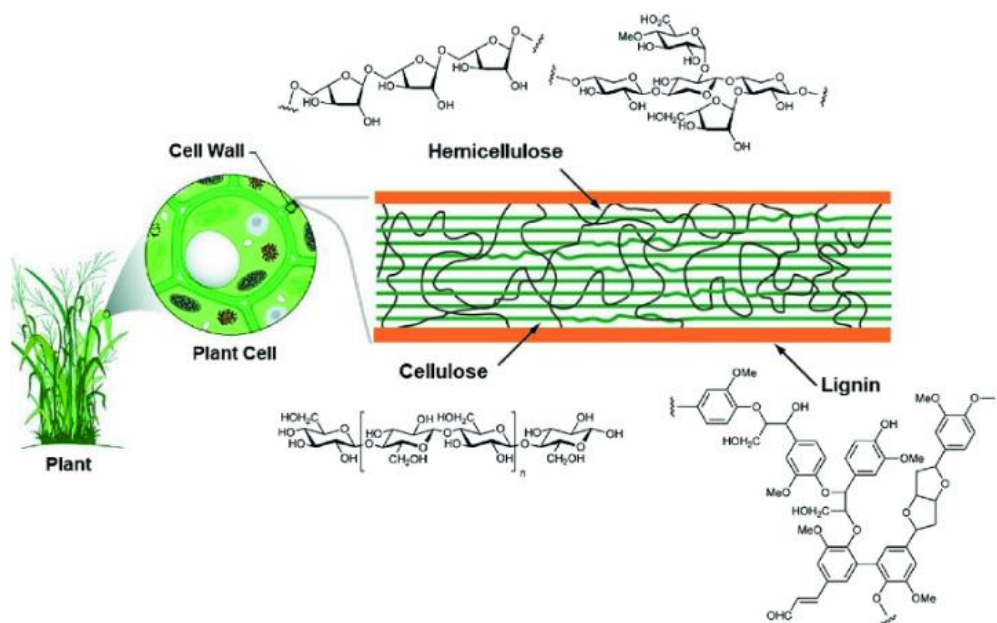
เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ปาล์มน้ำมัน (oil palm)

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) จัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย (ธีระ เอกสมทราเมษฐ์ และคณะ, 2548) เป็นพืชผสมข้าม ใบเลี้ยงเดี่ยว อยู่ในวงศ์ของปาล์ม (Palmae ปัจจุบันมีชื่อว่า Arecaceae) เป็นพืชยืนต้นที่ให้ผลผลิตทะลายสดได้ตลอดทั้งปี สามารถเจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อนชื้น อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของปาล์มน้ำมันอยู่ในช่วง 22–32 องศาเซลเซียส ภาคใต้เป็นแหล่งเพาะปลูกปาล์มน้ำมันที่สำคัญของประเทศไทย โดยจังหวัดสุราษฎร์ธานี กระบี่ นครศรีธรรมราช และสตูลเป็นพื้นที่เพาะปลูกที่สำคัญ เนื่องจากเป็นพื้นที่ที่มีฝนตกอย่างต่อเนื่อง จากข้อมูลปี 2564 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันทั้งหมด 6.08 ล้านไร่ มีปริมาณผลผลิต 16.79 ล้านตัน และมีผลผลิตต่อไร่เท่ากับ 2,764 กิโลกรัม (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2565)

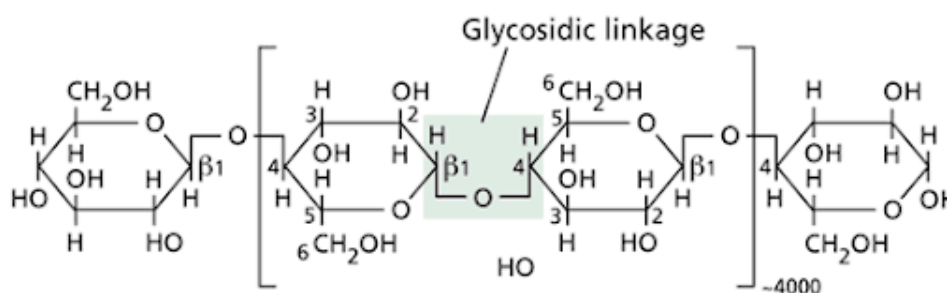
องค์ประกอบของผนังเซลล์ของพืช

ผนังเซลล์ของพืชส่วนใหญ่ หรือลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) ประกอบด้วย เซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และลิกนิน (lignin) (ภาพที่ 1)



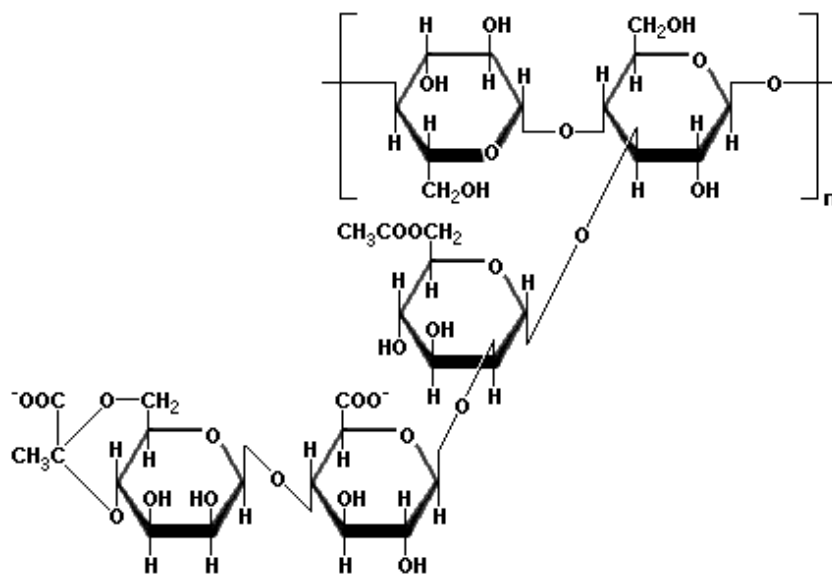
ภาพที่ 1 องค์ประกอบของผนังเซลล์พืช (ที่มา: Devi et al., 2019)

เซลลูโลสเป็นสารประกอบอินทรีย์มีโครงสร้างเป็นผลึก (crystalline) ที่ประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคส (D-glucose) (Mood *et al.*, 2013) ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1,4-glycosidic และ มีการเชื่อมต่อระหว่างสายด้วยพันธะไฮโดรเจน (ภาพที่ 2) พบที่ผนังเซลล์พืช เซลลูโลสละลายน้ำ ได้น้อย การย่อยสลายเซลลูโลสสามารถทำได้โดยการใช้วิธีทางเคมี เช่น การใช้กรดในการตัด พันธะ หรือการใช้ตัวเร่งทางชีวภาพ (bio catalyst) คือ เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) ในการตัด พันธะ (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนานนท์, 2015)



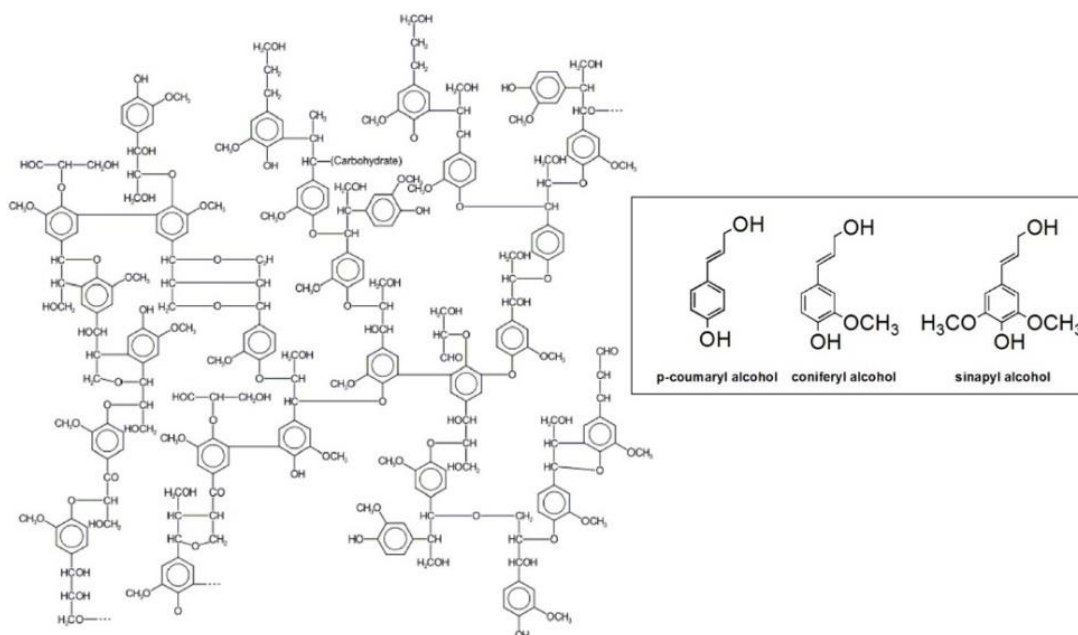
ภาพที่ 2 โครงสร้างของเซลลูโลส (ที่มา: Taiz *et al.*, 2014)

เฮมิเซลลูโลสเป็นโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) มีโครงสร้างเป็นเฮเทอโรโพลีแซคคาไรด์ (heteropolysaccharide) ที่ประกอบไปด้วยน้ำตาลมากกว่า 2 ชนิด ซึ่งน้ำตาลที่พบมากคือ ไซโลส (D-xylose) เป็นน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม (บุญล้อม ชีวะอิสระกุล, 2546) เชื่อมต่อกัน ด้วยพันธะไกลโคไซด์ (glycosidic bond) ที่ตำแหน่ง 1,4- β เป็นโซ่หลัก อาจมีน้ำตาลชนิดอื่น ๆ มา ต่อกันเป็นโซ่สาขา (Zhao *et al.*, 2007) (ภาพที่ 3) เฮมิเซลลูโลสมีความแข็งแรงน้อยกว่าเซลลูโลส ไม่สามารถละลายน้ำได้ แต่สามารถย่อยสลายได้โดยกรด เบส หรือเอนไซม์ (Mood *et al.*, 2013)



ภาพที่ 3 โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส (ที่มา: Kulkarni *et al.*, 2012)

ลิกนินเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีฟีนิลโพรเพน (phenylpropane; $\text{C}_6\text{-C}_3$) 3 หน่วยย่อยประกอบรวมกัน ได้แก่ พาราโคมาริลแอลกอฮอล์ (p-coumaryl alcohol) โคนิเฟอริลแอลกอฮอล์ (coniferyl alcohol) และไซนิพริลแอลกอฮอล์ (sinapyl alcohol) โดยเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ (ester) มากกว่า 2 พันธะ (ภาพที่ 4) และยังมีพันธะเดี่ยวเชื่อมระหว่างคาร์บอนของแต่ละโมเลกุลของสารประกอบทำให้ลิกนินมีความเสถียรสูง ในธรรมชาติลิกนินจับตัวอยู่รอบ ๆ โมเลกุลเซลลูโลส และเกิดพันธะโควาเลนต์ระหว่างลิกนินกับเซลลูโลสกลายเป็นสารประกอบลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) การย่อยสลายลิกนินทำได้โดยการใช้กรด หรือเบส (Singh *et al.*, 2014) และมีรายงานว่าเชื้อรากลุ่มราฟุสสีขาว (white rot fungi) สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน (lignin-degrading enzyme) โดยราชนิดนี้ทำให้น้ำไม้ที่ถูกย่อยมีสีซีดจางลง (Wang, 2008)



ภาพที่ 4 โครงสร้างของลิกลิน (ที่มา: Christopher *et al.*, 2014)

2. โรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมัน (basal stem rot disease)

โรคลำต้นเน่าในปาล์มน้ำมันเกิดจากเชื้อรา *Ganoderma boninense* หรือชื่อปัจจุบันคือ *G. orbiforme* (<https://www.mycobank>) เป็นเชื้อราในกลุ่มราผู้สีขาว (Abubakar *et al.*, 2022) อยู่ในไฟลัม Basidiomycota สามารถย่อยสลายองค์ประกอบของเซลล์ในเนื้อไม้ได้ รวมทั้งลิกลิน ซึ่งสามารถจัดจำแนกอนุกรมวิธาน ดังนี้

Kingdom: Fungi

Phylum: Basidiomycota

Class: Agaricomycetes

Order: Polyporales

Family: Ganodermataceae

Genus: *Ganoderma*

Species: *Ganoderma orbiforme*

G. orbiforme เป็นเชื้อราที่มีรูเล็ก ๆ จำนวนมากอยู่ด้านล่างของดอก (basidiocarp) มักพบในภูมิภาคกึ่งเขตร้อน และเขตร้อน (Moncalvo and Ryvarden, 1998) อาการของโรคที่เกิดมัก

แสดงออกดังนี้คือ ใบล่างของปาล์มน้ำมันเปลี่ยนเป็นสีเหลืองแห้ง แล้วหักพับลงรอบลำต้น ใบยอดไม่คลี่ เมื่ออาการของโรครุนแรงมากขึ้นปาล์มน้ำมันจะยืนต้นตาย และพบดอกเห็ด (basidiocarp) บริเวณลำต้นส่วนล่างของปาล์มน้ำมัน (Rees *et al.*, 2009) (ภาพที่ 5) มีรายงานว่าพบโรคในปาล์มน้ำมันมากขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อมีการปลูกปาล์มน้ำมันซ้ำ ๆ ในพื้นที่ที่มีเศษซากของต้นปาล์มน้ำมันอยู่ในแปลง (Flood *et al.*, 2002) เชื้อรา *G. orbiforme* เป็นเชื้อราในดินที่ยากต่อการจัดการ สามารถแพร่กระจายได้โดยการที่รากของปาล์มน้ำมันที่เป็นโรคสัมผัสกับรากของ



ปาล์มน้ำมันที่ไม่เป็นโรค หรือโดยสปอร์ของเชื้อที่อยู่ภายในดอกเห็ด (Rani *et al.*, 2020)

ภาพที่ 5 ลักษณะอาการของโรคลำต้นเน่า ก) ต้นปาล์มน้ำมันที่แสดงอาการของโรคลำต้นเน่าอย่างรุนแรง ข) ดอกเห็ดที่บริเวณลำต้นส่วนล่างของปาล์มน้ำมัน

(ที่มา: <https://www.palmelit.com/en/news/selection-of-ganoderma-resistant-material>)

เชื้อรา *G. orbiforme* สร้างดอกเห็ดลักษณะคล้ายพัดมีสีน้ำตาลแดง ขอบสีขาว ผิวด้านบนเรียบเป็นมันคล้ายทาด้วยแลคเกอร์ (ภาพที่ 6) ส่วนผิวด้านล่างมีสีขาวขุ่นเต็มไปด้วยรูขนาดเล็กที่สามารถสร้างสปอร์สีน้ำตาลจากนั้นสปอร์จะแพร่กระจายลงไปในดิน หรือฟุ้งกระจายในอากาศ (สมพร ณ นคร และคณะ, 2560)



ภาพที่ 6 ดอกเห็ดที่เกิดจากเชื้อ *Ganoderma boninense*

(ที่มา: <http://www.aarsb.com.my/wp-content/Publication/Newsletter/PDF/2005-Apr.pdf>)

3. เอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน (ligninolytic enzyme)

ลิกนินทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมในผนังเซลล์พืช ช่วยให้โครงสร้างของผนังเซลล์พืชคงรูป และป้องกันการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ เอนไซม์ย่อยสลายลิกนินเป็นเอนไซม์ออกซิเดชัน (oxidative enzymes) มี 3 ชนิดหลัก ๆ ได้แก่ เอนไซม์แลคเคส (laccase; lac) ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (lignin peroxidase; LiP) และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (manganese peroxidase; MnP) (Dias *et al.*, 2010)

แลคเคส (EC 1.10.3.2) เป็นเอนไซม์ที่ประกอบด้วยทองแดง (Cu) หลายอะตอมซึ่งสามารถออกซิไดส์สารประกอบฟีนอลิก และสารประกอบอื่น ๆ ได้โดยการให้โมเลกุลของออกซิเจนให้สลายกลายเป็นโมเลกุลของน้ำ และไม่จำเป็นต้องทำงานร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) (Canas and Camarero, 2010)

ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (EC 1.11.1.14) เป็นเอนไซม์ที่สามารถลดโมเลกุลของออกซิเจนให้ได้สารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxidase) และซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide) โดยต้องทำงานร่วมกับสารประกอบไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) (Mehboob *et al.*, 2011)

แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (EC 1.11.1.13) ทำงานร่วมกับสารประกอบไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และเปลี่ยน Mn^{2+} เป็น Mn^{3+} เพื่อออกซิไดส์สารประกอบฟีนอลิก และองค์ประกอบอื่น ๆ (Asgher *et al.*, 2016)

Flood และคณะ (2002) รายงานว่า *G. boninense* เป็นเชื้อราที่สร้างความเสียหายร้ายแรงที่สุดของปาล์มน้ำมันในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเชื้อหลังเอนไซม์แลคเคส ลิกนินเปอร์ออกซิเดส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ไปย่อยสลายลิกนินซึ่งเป็นผนังเซลล์ของพืชทำให้ลำต้นของปาล์มน้ำมันเสียหาย ส่งผลให้ผลผลิตที่ได้ลดลง และเมื่อการเข้าทำลายของโรคมากขึ้นปาล์มน้ำมันจะยืนต้นตาย และจากรายงานของ Paterson (2007); Paterson และคณะ (2008 และ 2009) เชื้อ *G. boninense* สามารถสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยคาร์โบไฮเดรต และย่อยสลายลิกนินได้ในปริมาณมากกว่าเชื้อราสาเหตุโรคชนิดอื่น ๆ จึงส่งผลให้เกิดโรคมีความรุนแรงมากกว่าเชื้อราสาเหตุโรคอื่น

4. ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน

4.1 ปัจจัยทางกายภาพ (physical factor)

ปัจจัยทางกายภาพ หมายถึง องค์ประกอบทางกายภาพ หรือสภาพแวดล้อมที่ไม่มีชีวิตซึ่งมีอิทธิพลต่อสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิ แสงสว่าง ดิน น้ำ อากาศ และค่าความเป็นกรด-ด่าง ซึ่งมีการทดสอบโดยนำปัจจัยทางกายภาพ เช่น อุณหภูมิ ความชื้น ค่าความเป็นกรด-ด่าง และแสง มาใช้เพื่อควบคุมการเจริญของเชื้อ *Ganoderma* spp. ยกตัวอย่างเช่น Rees และคณะ (2007) ศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *G. boninense* (BLRS1 และ GMR3) โดยศึกษาที่อุณหภูมิระหว่าง 25–45 °C พบว่าที่อุณหภูมิ 25–30 °C เส้นใยของเชื้อ *G. boninense* เจริญได้เป็นอย่างดี และเส้นใยของเชื้อเจริญได้ลดลงที่อุณหภูมิ 36 °C แต่เมื่อนำเชื้อกลับมาบ่มที่อุณหภูมิ 28 °C เส้นใยก็สามารถกลับมาเจริญได้ดีอีกครั้ง นอกจากนี้ยังพบว่าที่อุณหภูมิ 40 °C ไม่พบการเจริญของเส้นใยของเชื้อ *G. boninense*

Zhang and Tang (2008) ได้ศึกษาคุณภาพของแสง ได้แก่ แสงสีฟ้า (390-500 nm) สีแดง (560-700 nm) สีขาว (400-740 nm) และในที่มืด สำหรับการเจริญของเชื้อ *G. lucidum* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว (submerged) พบว่าการเจริญของเชื้อ *G. lucidum* ภายใต้แสงสีขาว (0.159/วัน) มีอัตราการเจริญสูงกว่าการเลี้ยงเชื้อภายใต้แสงสีฟ้า (0.136/วัน) ที่มืด (0.135/วัน) และสีแดง (0.118/วัน) และพบว่าการเลี้ยงเชื้อภายใต้แสงสีขาวทำให้เชื้อ *G. lucidum* มีชีวมวลสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเลี้ยงในสภาพแสงอื่น ๆ

Mehboob และคณะ (2011) ศึกษาอัตราส่วนของของแข็ง (กรัม) และของเหลว (%) ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (solid state media) ที่เพาะเลี้ยงเชื้อ *G. lucidum* โดยศึกษาในอัตราส่วน 5:10, 5:15, 5:20 และ 5:25 และวิเคราะห์ผลของกิจกรรมเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส พบว่าที่

อัตราส่วน 5:20 เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสมีค่ากิจกรรมสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราส่วนอื่น ๆ ดังนั้นความแตกต่างของความชื้นที่เลี้ยงเชื้อ *G. lucidum* จึงมีผลต่อการเจริญของเส้นใยและค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส

Rahman และคณะ (2020) ศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสารละลาย CaCO_3 ในดินที่เลี้ยงเชื้อ *G. boninense* โดยทดสอบที่ pH 4.5, 5.0, 6.0 และ 7.0 พบว่าที่ pH 6.0 เหมาะสมต่อการเจริญของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ใช้ในการทดสอบ โดยต้นกล้ามีความยาวราก ปริมาตรราก และพื้นที่ผิวรากเพิ่มขึ้น เนื่องจากที่ระดับ pH 6.0 ทำให้กิจกรรมของจุลินทรีย์ในดินเพิ่มขึ้น ซึ่งจุลินทรีย์ในดินสามารถเพิ่มการดูดซึมธาตุอาหารของพืช และลดการเข้าทำลายของเชื้อ *G. boninense* ได้

4.2 ปัจจัยทางเคมี (chemical factor)

ปัจจัยทางเคมี หมายถึง องค์ประกอบทางเคมีต่าง ๆ ที่มีผลต่อสิ่งมีชีวิต เช่น แร่ธาตุ ธาตุอาหาร กรดอินทรีย์ สารประกอบฟีนอลิก และสารพิษ ซึ่งนอกเหนือจากการใช้สารเคมีกำจัดเชื้อราที่มีขายทางการค้าแล้ว ยังมีรายงานเกี่ยวกับการนำธาตุอาหาร สารประกอบฟีนอลิก และกรดอินทรีย์มาใช้ในการยับยั้งการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อ *Ganoderma* spp. โดย Shu และคณะ (2006); Li และ Yu (2013) และ Manavalan และคณะ (2015) รายงานว่าไอออนของโลหะจำพวก Hg^{2+} , Fe^{2+} และ Cr^{2+} สามารถยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินที่เชื้อ *G. lucidum* ผลิตขึ้น โดยการรบกวนปฏิกิริยาที่เกิดตรงบริเวณ active site ของเอนไซม์

Chong และคณะ (2009) ศึกษาความเป็นพิษของ syringic acid, caffeic acid และ 4-hydroxybenzoic acid ต่อเชื้อ *G. boninense* บนอาหาร PDA โดยปรับสารประกอบทั้ง 3 ชนิดให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5–2.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และแต่ละความเข้มข้นต่างกัน 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรพบว่า syringic acid (0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร), caffeic acid และ 4-hydroxybenzoic acid (2.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *G. boninense* บนอาหาร PDA ได้

Bivi และคณะ (2016) รายงานว่าธาตุทองแดง แคลเซียม และ salicylic acid สามารถลดความรุนแรงของโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมัน โดยจะลดการทำงานของ ergosterol ซึ่งเป็นสเตอรอลที่มีความสัมพันธ์ในการแพร่กระจายของเส้นใยที่เชื้อ *G. boninense* สร้างขึ้น และยังสามารถส่งเสริมกระบวนการสร้างลิกนินของพืชได้

จากรายงานของ Rakib และคณะ (2017) พบว่า Cu^{2+} ที่ความเข้มข้น 5.64–5.87 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และ Zn^{2+} ที่ความเข้มข้น 15.03–15.93 มิลลิกรัม/กิโลกรัม สามารถยับยั้งการเจริญ และลด

การพัฒนาของเชื้อ *Ganoderma* sp. เนื่องจากธาตุ Cu และ Zn เป็น cofactor ที่เกี่ยวข้องกับกลไกในการป้องกันตัวของพืช

Surendran และคณะ (2018) ที่ให้เห็นว่าสารประกอบฟีนอลิก เช่น benzoic acid และ salicylic acid และธาตุอาหาร เช่น Fe^{2+} สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และลิกนินเปอร์ออกซิเดส ส่วนธาตุ Zn^{2+} สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แลคเคสที่เชื้อ *G. boninense* ผลิตขึ้น โดยการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของกรดอะมิโน หรือปรับเปลี่ยนไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ของเอนไซม์

จากรายงานของ Siddiqui และคณะ (2019) พบว่า ethylene diamine tetra acetic acid สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และแลคเคสของเชื้อ *Ganoderma* sp. ส่วนสาร thioglycolic acid สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส โดยการเปลี่ยนแปลง active site ของเอนไซม์ทำให้เอนไซม์หยุดทำงาน

การศึกษานิต และปริมาณธาตุอาหารที่ส่งผลต่อเชื้อ *G. orbiforme* ยังต้องคำนึงถึงธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของต้นปาล์มน้ำมันด้วยเช่นกัน จากการศึกษาของ Uexkull and Fairhurst (1991) ที่ศึกษาความเข้มข้นของธาตุอาหารในทางใบที่ 17 ของปาล์มน้ำมัน ที่อายุน้อยกว่า 6 ปี และในปาล์มน้ำมันที่มีอายุมากกว่า 6 ปี พบว่าธาตุอาหารที่ปาล์มน้ำมันต้องการคือ N, P, K, Mg, Ca, S, Cl, B, Cu และ Zn (ตารางที่ 1) และความต้องการธาตุอาหารของปาล์มน้ำมันจะแตกต่างกันไปตามช่วงอายุของปาล์มน้ำมัน (สมพร ณ นคร และคณะ, 2560)

จากรายงานของ Keiblinger และคณะ (2016) ที่ศึกษาความคงตัวของดินหลังจากเติม $CaCO_3$ เป็นเวลา 3 เดือน ในสภาพโรงเรือน พบว่าเมื่อเติม $CaCO_3$ ส่งผลให้ค่า pH ของดินจากเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ Chen และคณะ (2020) ศึกษา $CaCO_3$ อัตราส่วน 0, 5, 10, 15 และ 20% ในดินเหนียว เพื่อศึกษาโครงสร้างจุลภาค และความแข็งแรงของดิน พบว่ายิ่งอัตราส่วนของ $CaCO_3$ มากขึ้นส่งผลให้ความหนาแน่น และความพรุนของดินเปลี่ยนแปลงไป โดยอัตราส่วนที่ส่งผลมากที่สุดคือ การเติม $CaCO_3$ 20%

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของธาตุอาหารในทางใบที่ 17 ของปาล์มน้ำมัน ที่อายุน้อยกว่า 6 ปี และในปาล์มน้ำมันที่มีอายุมากกว่า 6 ปี

อายุปาล์มน้ำมัน	ธาตุอาหาร	ขาด	เหมาะสม	เกิน
ปาล์มเล็ก (น้อยกว่า 6 ปี)	ไนโตรเจน (%)	< 2.50	2.60–2.90	> 3.10
	ฟอสฟอรัส (%)	< 0.15	0.16–0.19	> 0.25
	โพแทสเซียม (%)	< 1.00	1.10–1.30	> 1.80
	แมกนีเซียม (%)	< 0.20	0.30–0.45	> 0.70
	แคลเซียม (%)	< 0.30	0.50–0.70	> 0.70
	ซัลเฟอร์ (%)	< 0.20	0.25–0.40	> 0.60
	คลอรีน (%)	< 0.25	0.50–0.70	> 1.00
	โบรอน (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	< 8	15–25	> 35
	ทองแดง (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	< 3	5–7	> 15
ปาล์มใหญ่ (มากกว่า 6 ปี)	สังกะสี (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	< 10	15–20	> 50
	ไนโตรเจน (%)	< 2.30	2.40–2.80	> 3.00
	ฟอสฟอรัส (%)	< 0.14	0.15–0.18	> 0.25
	โพแทสเซียม (%)	< 0.75	0.90–1.20	> 1.60
	แมกนีเซียม (%)	< 0.20	0.25–0.40	> 0.70
	แคลเซียม (%)	< 0.25	0.50–0.75	> 1.00
	ซัลเฟอร์ (%)	< 0.20	0.25–0.35	> 0.60
	คลอรีน (%)	< 0.25	0.50–0.70	> 1.00
	โบรอน (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	< 8	15–25	> 40
	ทองแดง (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	< 3	5–8	> 15
	สังกะสี (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	< 10	12–18	> 80

ที่มา: Uexkull and Fairhurst (1991)

4.3 ปัจจัยทางชีวภาพ (Biological factor)

จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ หมายถึง แบคทีเรีย รา ยีสต์ หรือไวรัส ที่มีความสามารถในการควบคุมหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืช แมลงศัตรูพืช รวมทั้งไปลดกิจกรรมของเชื้อก่อโรคได้

จุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีกลไกในการควบคุม หรือยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืช 4 กลไก ได้แก่ 1) การแข่งขัน (competition) 2) การเป็นปรสิต (parasitism) 3) การยับยั้งและทำลายชีวิต (antibiosis) และ 4) การชักนำให้พืชเกิดความต้านทาน (induced resistance) (Fravel *et al.*, 2003; Howell, 2003; Benitez *et al.*, 2004; Viterbo *et al.*, 2007; Woo and Lorito, 2007; Vinale *et al.*, 2008)

จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่นิยมใช้ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่เป็นเชื้อราในสกุล *Trichoderma* spp. เนื่องจากเป็นเชื้อราที่มีกลไกการเป็นปฏิปักษ์ครบทั้ง 4 กลไก มีการเจริญได้อย่างรวดเร็ว และสามารถทนต่อสารเคมี ทำให้มีประสิทธิภาพเป็นอย่างมากในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรค (Kuhls *et al.*, 1999) ดังนั้นจึงมีการนำเชื้อ *Trichoderma* spp. มาใช้เพื่อควบคุมเชื้อ *G. boninense* โดย Sundram (2013) ได้ศึกษาพบว่า เชื้อ *T. asperellum* T9 และ *T. virens* T29 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *G. boninense* ได้โดยการหลั่งสารต่อต้านเชื้อราจากการทดสอบด้วยวิธี dual culture และการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อ

Angel และคณะ (2016) พบว่า เชื้อ *T. virens* 7b หลั่งสาร phenylethyl alcohol (PEA) ซึ่งสามารถสร้างความเสียหายอย่างรุนแรงต่อเส้นใยของเชื้อ *G. boninense* โดยสังเกตได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

จากการศึกษาของ Naher และคณะ (2018) พบว่า เชื้อ *T. harzianum* T 32 สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อ *G. boninense* upm 001 โดยการสร้างเส้นใยพันรัดรอบเส้นใยของเชื้อ *G. boninense* upm 001 ทำให้เส้นใยของเชื้อเกิดความผิดปกติ และพบยีนของโคตินินสที่เชื้อ *T. harzianum* T 32 สร้างขึ้น

นอกจากนี้การศึกษาของ Muniroh และคณะ (2019) พบว่า เชื้อ *T. asperellum* สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อ *G. boninense* โดยทำให้เส้นใยบวมผิดปกติ และเชื้อ *T. asperellum* ก็สามารถผลิต IAA เพื่อชักนำให้พืชเกิดความต้านทาน และส่งเสริมการเจริญของพืช

5. การเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแบบแข็ง (solid-state cultivation)

การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์มี 2 วิธี คือ 1) การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเหลว (submerged culture) โดยวิธีการนี้ส่วนมากใช้ในการผลิตเอนไซม์ในเชิงอุตสาหกรรม แต่ก็ยังเป็นวิธีการที่ใช้ต้นทุนสูง และพบปัญหาเกี่ยวกับการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์อื่น 2) การเลี้ยงเชื้อราบนอาหารแบบแข็ง (solid state culture) เป็นการเลี้ยงเชื้อบนวัสดุที่เป็นของแข็งที่ปราศจากน้ำ

หรือมีน้ำอยู่น้อย แต่มีความชื้นเพียงพอที่เหมาะสมแก่การเจริญของจุลินทรีย์ (Bastos *et al.*, 2016) ซึ่งที่ผ่านมาได้มีการใช้วิธีเลี้ยงเชื้อบนอาหารแบบแข็ง เพื่อผลิตเอนไซม์หลายชนิด เช่น การศึกษาของ Hermann และคณะ (2013) ที่เปรียบเทียบการเลี้ยงเชื้อรา *Lentinula edodes* และ *L. boryana* ในอาหารเหลว และในอาหารแบบแข็ง เพื่อศึกษาการสร้างเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสมีค่ากิจกรรมสูงสุดในวันที่ 25 โดย *L. boryana* ผลิตได้ 70 UI/L และ *L. edodes* ผลิตได้ 20 UI/L ส่วนในการเลี้ยงด้วยอาหารแบบแข็งที่มีส่วนผสมของขี้เลื่อย และกากถั่วเหลือง พบว่าเชื้อ *L. edodes* ผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสได้สูงสุดในวันที่ 10 และ *L. boryana* ผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสสูงสุดในระหว่างวันที่ 20–25 โดยค่ากิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสรวมประมาณ 110 UI/L จึงสรุปได้ว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารแบบแข็งใช้เวลาในการผลิตเอนไซมน้อยกว่าการเลี้ยงเชื้อราด้วยอาหารเหลว นอกจากนี้ Amriani และคณะ (2016) ได้เลี้ยงเชื้อ *G. boninense* ในอาหารแบบแข็ง ซึ่งใช้ผักตบชวาเป็นวัสดุ (substrate) เลี้ยงเชื้อ เป็นเวลา 7 วัน พบว่าปริมาณของลิกนินและเซลลูโลสลดลงเมื่อปลูกเชื้อ *G. boninense* ทำให้ทราบว่าเชื้อ *G. boninense* สามารถย่อยสลายลิกนินและเซลลูโลสได้

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่ออธิบายปัจจัยทางกายภาพ เคมี และชีวภาพ ที่ส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ย่อยลิกนินที่เชื้อ *G. orbiforme* ผลิตขึ้นในสภาพห้องปฏิบัติการ
2. เพื่อให้ได้ข้อมูลสำหรับจัดทำคู่มือการจัดการปัจจัยทางกายภาพ เคมี และชีวภาพไปประยุกต์ใช้ควบคุมโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมัน

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

การเตรียมเชื้อราสาเหตุโรค และเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้ความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการเกษตร สาขานวัตกรรมและการจัดการ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ คือเชื้อ *G. orbiforme* ไอโซเลต K4/2 และเชื้อ *Trichoderma* spp. 4 ไอโซเลต คือ *Trichoderma* sp. Z2-02, *Trichoderma* sp. Trg3-8, *T. asperellum* K1-02 และ *T. asperellum* T76-14 ซึ่งเชื้อ *Trichoderma* spp. ทั้ง 4 ไอโซเลตได้คัดเลือกจากการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อรา โดยเอนไซม์ที่ทดสอบคือ เอนไซม์ไคติเนส และเบต้า-1,3-กลูคาเนส ทำการเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรค และเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA: มันฝรั่ง 200 กรัม กลูโคส 20 กรัม ผงวุ้น 17 กรัม น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ($^{\circ}\text{C}$) นาน 5–7 วัน

การสกัดเอนไซม์แบบหยาบ

ทุกการทดลองในงานวิจัยนี้จะสกัดเอนไซม์แบบหยาบ เพื่อนำไปวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์หลังจากเลี้ยงเชื้อ *G. orbiforme* K4/2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง เต็มบัฟเฟอร์ (เหมาะสม) 10 มิลลิลิตร บ่มเป็นเวลา 1 วัน บนเครื่องเขย่าอัตโนมัติที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที แล้วนำของเหลวที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 10°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นกรองเฉพาะส่วนใสเก็บในหลอดเซนติฟิวจ์ (centrifuge tube) ขนาด 50 มิลลิลิตร

การวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์

เอนไซม์แลคเคส (laccase)

การหาค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคส โดยใช้ 4 mM 2,6-dimethoxyphenol (DMP) ละลายในน้ำกลั่น 50 ไมโครลิตร เป็นสารตั้งต้น แล้วผสมกับ 50 mM acetate buffer (pH 5.0) 500 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 350 ไมโครลิตร และตัวอย่างเอนไซม์ 100 ไมโครลิตร ลงใน cuvette จากนั้นผสมสารให้เข้ากัน แล้วนำใส่เครื่องวัดค่าดูดกลืนคลื่นแสงรุ่น UV 5300 (METASH, China) ที่ความยาวคลื่น 470 nm จดบันทึกค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่เปลี่ยนแปลงไปเป็นเวลา 2 นาที (Wariishi *et al.*, 1992)

เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (MnP)

การหาค่ากิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส โดยใช้ 4 mM 2,6-dimethoxyphenol (DMP) ละลายในน้ำกลั่น 50 ไมโครลิตร เป็นสารตั้งต้น แล้วผสมกับ 50 mM acetate buffer (pH 5.0) 500 ไมโครลิตร 1mM MnSO₄ 350 ไมโครลิตร และตัวอย่างเอนไซม์ 100 ไมโครลิตร ลงใน cuvette จากนั้นผสมสารให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่เปลี่ยนแปลงไปที่ความยาวคลื่น 470 nm เป็นเวลา 2 นาที (Wariishi *et al.*, 1992)

เอนไซม์ลิกกินินเปอร์ออกซิเดส (LiP)

การหาค่ากิจกรรมเอนไซม์ลิกกินินเปอร์ออกซิเดส โดยใช้ 10 mM 3-ethylbenthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) ละลายในบัฟเฟอร์ 100 ไมโครลิตร เป็นสารตั้งต้น แล้วผสมกับ 50 mM acetate buffer (pH 5.0) 750 ไมโครลิตร 0.3 % H₂O₂ 100 ไมโครลิตร และตัวอย่างเอนไซม์ 50 ไมโครลิตร ลงใน cuvette จากนั้นผสมสารให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่เปลี่ยนแปลงไปที่ความยาวคลื่น 420 nm เป็นเวลา 2 นาที (Kuwahara *et al.*, 1984)

การคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด มีวิธีดังสมการ

$$\text{Enzyme activity (U/ml.)} = \frac{\Delta A}{\alpha \times \epsilon \times b \times t}$$

ΔA = ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่วัดได้ ณ 2 นาที ลบด้วยค่ากิจกรรมเอนไซม์ ณ นาทีที่เริ่มต้น
($A_2 - A_0$)

α = ปริมาตรเอนไซม์/ปริมาตรสารทั้งหมด (ไมโครลิตร)

ϵ = ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนคลื่นแสง (extinction coefficient) ของสารตั้งต้น ($\text{cm}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$)

b = ระยะทางที่แสงส่องผ่าน (path length) cuvette (เซนติเมตร)

t = เวลาที่ใช้ (นาที)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดลองทั้งหมดเป็นการวางแผนการทดลองแบบสุ่มโดยสมบูรณ์ (completely randomized design; CRD) ซึ่งวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธี Analysis of variance (ANOVA) โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละกรรมวิธีด้วย Tukey's honestly significant difference test (Tukey's HSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ในงานวิจัยครั้งนี้แบ่งการศึกษาออกเป็น 3 ส่วนใหญ่ ๆ คือ 1. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *Ganoderma orbiforme* K4/2 บนอาหารเลี้ยงแบบแข็ง 2. ทดสอบปัจจัยทางกายภาพ เคมี และชีวภาพที่สามารถยับยั้งการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน และ 3. ทดสอบปัจจัยทางกายภาพ และเคมีที่สามารถยับยั้งค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน

ส่วนที่ 1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *Ganoderma orbiforme* K4/2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง

1.1 การคัดเลือกวัสดุ (substrate) จากปาล์มน้ำมันในการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแบบแข็ง

นำกาบใบ (leaf scar) ทางใบ (petiole) และใบ (leaf) ของปาล์มน้ำมันไปตัดให้มีขนาด 1-2 เซนติเมตร ปริมาณ 1 กรัม ใส่ในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร จากนั้นปิดฝาขวดด้วยฟอยล์อะลูมิเนียม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะขึ้นรู้นเชื้อ *G. orbiforme* K4/2 วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งจำนวน 3 ชิ้น/ขวด บ่มที่อุณหภูมิ 28±2 °C แล้วนำไปสกัดหยาบเพื่อวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินที่เชื้อ *G. orbiforme* K4/2 ผลิตขึ้นในสภาพห้องปฏิบัติการ

1.2 การคัดเลือกอัตราส่วนระหว่างของแข็งและของเหลว (solid:liquid ratio)

นำใบปาล์มน้ำมัน (จากการทดลองที่ 1.1) ขนาด 1-2 เซนติเมตร ปริมาณ 1 กรัม ใส่ในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นในอัตราส่วนระหว่างของแข็งและของเหลว (S:L) 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 (Li et al., 2022), 1:6, 1:7 และ 1:8 (ทดสอบกรรมวิธีละ 5 ซ้ำ) จากนั้นปิดฝาขวดด้วยฟอยล์อะลูมิเนียม แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที วางเชื้อ *G. orbiforme* K4/2 โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะขึ้นรู้นแล้ววางเชื้อบนอาหารแบบแข็งจำนวน 3 ชิ้น/ขวด บ่มที่อุณหภูมิ 28±2 °C หลังจากนั้นนำไปสกัดหยาบแล้ววัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินที่เชื้อ *G. orbiforme* K4/2 ผลิตขึ้นในสภาพห้องปฏิบัติการ

1.3 การคัดเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสม

ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะขึ้นรู้นเชื้อ *G. orbiforme* K4/2 วางบนอาหารแบบแข็ง (จากการทดลองที่ 1.1 และ 1.2) จำนวน 3 ชิ้น/ขวด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ

25, 28, 30, 35 และ 40 °C (Rees *et al.*, 2007) กรรณวิธีละ 5 ชั่วโมง แล้วนำไปสกัดเอนไซม์แบบหยาบเพื่อวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส ลิกนินเปอร็อกซิเดส และแมงกานีสเปอร็อกซิเดส

1.4 การคัดเลือกเวลาในการบ่มเชื้อที่เหมาะสม

ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะขึ้นรู้นเชื้อ *G. orbiforme* K4/2 วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (จากการทดลองที่ 1.1 และ 1.2) จำนวน 3 ชั้น/ขวด บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม (จากการทดลองที่ 1.3) โดยใช้ระยะเวลาที่แตกต่างกันดังนี้ คือ 4, 8, 12, 16, 20 และ 24 วัน (Rees *et al.*, 2007) กรรณวิธีละ 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปสกัดเอนไซม์แบบหยาบเพื่อวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส ลิกนินเปอร็อกซิเดส และแมงกานีสเปอร็อกซิเดส

1.5 การคัดเลือกบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมเพื่อใช้สกัดสารละลายเอนไซม์แบบหยาบ

นำเชื้อ *G. orbiforme* K4/2 ที่เลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (จากการทดลองที่ 1.1) มาสกัดเอนไซม์แบบหยาบด้วยการเติม 50 mM Acetate buffer (pH 5.0 และ 5.5) และ 50 mM Potassium phosphate buffer (KPB) pH 6.0, 6.5, 7.0 และ 7.5 (Madiah *et al.*, 2014) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ เพื่อทดสอบบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์แบบหยาบ บ่มเป็นเวลา 1 วัน บนเครื่องเขย่าอัตโนมัติที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที นำของเหลวที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 10 °C เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำส่วนใสที่ได้ไปวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ของแลคเคส ลิกนินเปอร็อกซิเดส และแมงกานีสเปอร็อกซิเดส

ส่วนที่ 2 การทดสอบปัจจัยทางกายภาพ เคมี และชีวภาพที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยลิกนินของเชื้อ *Ganoderma orbiforme* K4/2

2.1 ปัจจัยทางกายภาพ

2.1.1 อิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ทดสอบความเป็นกรด-ด่าง โดยการปรับค่า pH ของของเหลว ให้เป็น 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 (Peng *et al.*, 2019) ด้วย 1 N Sodium hydroxide และ 1 N Hydrochloric acid แล้วเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (จากการทดลองที่ 1.1 และ 1.2) หลังจากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะขึ้นรู้นเชื้อ *G. orbiforme* K4/2 วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งจำนวน 3 ชั้น/ขวด บ่มที่อุณหภูมิ 28±2 °C เป็นเวลา 8 วัน กรรณวิธีละ 5 ชั่วโมง แล้วนำไปสกัดเอนไซม์แบบหยาบเพื่อนำไปวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ของแลคเคส ลิกนินเปอร็อกซิเดส และแมงกานีสเปอร็อกซิเดส

2.1.2 อิทธิพลของแสง

ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะขึ้นรู้น้ำเชื้อ *G. orbiforme* K4/2 วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (จากการทดลองที่ 1.1 และ 1.2) จำนวน 3 ชั้น/ขวด โดยบ่มในที่มืดเป็นเวลา 10 วัน ในที่แสง LED (ความยาวคลื่น 400–740 นาโนเมตร) เป็นเวลา 10 วัน ในที่แสง LED สลับกับที่มืด 5/5 วัน และภายใต้แสงสีฟ้า (blue light) ความยาวคลื่น 390–500 นาโนเมตร (Zhang and Tang, 2008) ที่อุณหภูมิ และเวลาที่เหมาะสม (จากการทดลองที่ 1.3 และ 1.4) กรรณวิธีละ 5 ซ้ำ หลังจากนั้นสกัดเอนไซม์แบบหยาบเพื่อนำไปวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส ลิกนินเปอร์ออกซิเดส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

2.2 ปัจจัยทางเคมี

2.2.1 อิทธิพลของธาตุอาหาร (nutrient)

เตรียมสารละลาย 10 ชนิด คือ ammonium sulphate ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$) ที่ความเข้มข้น 2.0, 2.5 และ 3.0%, boric acid (H_3BO_3) ที่ความเข้มข้น 0.08, 0.24 และ 0.4%, calcium chloride (CaCl_2) ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.6 และ 1.0%, copper sulfate (CuSO_4) ที่ความเข้มข้น 0.03, 0.09 และ 0.15%, dipotassium phosphate (K_2HPO_4) ที่ความเข้มข้น 0.7, 1.25 และ 1.8%, ferrous sulphate (FeSO_4) ที่ความเข้มข้น 0.002, 0.0035 และ 0.005%, magnesium sulphate (MgSO_4) ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.45 และ 0.7%, manganese sulfate (MnSO_4) ที่ความเข้มข้น 0.0025, 0.02125 และ 0.04%, phosphoric acid (H_3PO_4) ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.3% และ zinc sulfate (ZnSO_4) ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.45 และ 0.8% ซึ่งความเข้มข้นของธาตุอาหารแต่ละชนิดที่ทดสอบดัดแปลงจากความต้องการธาตุอาหารของปาล์มน้ำมันโดย Fairhurst และ Mutert (1999) กรรณวิธีทำละ 5 ซ้ำ แล้วปิดฝาขวดด้วยฟอยล์อะลูมิเนียม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะขึ้นรู้น้ำเชื้อ *G. orbiforme* K4/2 วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (จากการทดลองที่ 1.1 และ 1.2) โดยวาง 3 ชั้น/ขวด บ่มที่อุณหภูมิ และเวลาที่เหมาะสม (จากการทดลองที่ 1.3 และ 1.4) แล้วนำไปสกัดเอนไซม์แบบหยาบเพื่อวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส ลิกนินเปอร์ออกซิเดส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

2.2.2 อิทธิพลของสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound)

เตรียมสารประกอบฟีนอลิก 4 ชนิด คือ Azure B, guaiacol, phenol (Surendran *et al.*, 2018) และ salicylic acid (Bivi *et al.*, 2016) ที่มีความเข้มข้น 0, 10, 20 และ 30 mM กรรณวิธีละ 5 ซ้ำ ปิดฝาขวดด้วยฟอยล์อะลูมิเนียม แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ จากนั้นใช้

cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะขึ้นรู้นเชื้อ *G. orbiforme* K4/2 วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (จากการทดลองที่ 1.1 และ 1.2) โดยวาง 3 ชั้น/ขวด บ่มที่อุณหภูมิ และเวลาที่เหมาะสม (จากการทดลองที่ 1.3 และ 1.4) แล้วนำไปสกัดเอนไซม์แบบหยาบเพื่อวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส ลิกนินเปอร์ออกซิเดส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

2.2.3 อิทธิพลของกรดอินทรีย์ (organic acid)

เตรียมสารประกอบกรดอินทรีย์ 3 ชนิด คือ acetic acid (CH_3COOH), citric acid ($\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_7$) และ lactic acid ($\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_3$) (Jo *et al.*, 2009) ที่มีความเข้มข้น 0, 20, 40, 60 และ 80 mM โดยแต่ละกรรมวิธีทำ 5 ซ้ำ ปิดฝาขวดด้วยฟอยล์อะลูมิเนียม แล้วนำไปนิ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะขึ้นรู้นเชื้อ *G. orbiforme* K4/2 วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (จากการทดลองที่ 1.1 และ 1.2) โดยวาง 3 ชั้น/ขวด บ่มที่อุณหภูมิ และเวลาที่เหมาะสม (จากการทดลองที่ 1.3 และ 1.4) แล้วนำไปสกัดเอนไซม์แบบหยาบเพื่อวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส ลิกนินเปอร์ออกซิเดส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

2.2.4 อิทธิพลของปูนขาว (CaCO_3)

เตรียม CaCO_3 ที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20% (Chen *et al.*, 2020) โดยแต่ละกรรมวิธีทำ 5 ซ้ำ ปิดฝาขวดด้วยฟอยล์อะลูมิเนียม แล้วนำไปนิ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะขึ้นรู้นเชื้อ *G. orbiforme* K4/2 วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (จากการทดลองที่ 1.1 และ 1.2) โดยวาง 3 ชั้น/ขวด บ่มที่อุณหภูมิ และเวลาที่เหมาะสม (จากการทดลองที่ 1.3 และ 1.4) แล้วนำไปสกัดเอนไซม์แบบหยาบเพื่อวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส ลิกนินเปอร์ออกซิเดส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

2.3 ปัจจัยทางชีวภาพ

2.3.1 การทดสอบกลไกการแก่งแย่งแข่งขัน (competition)

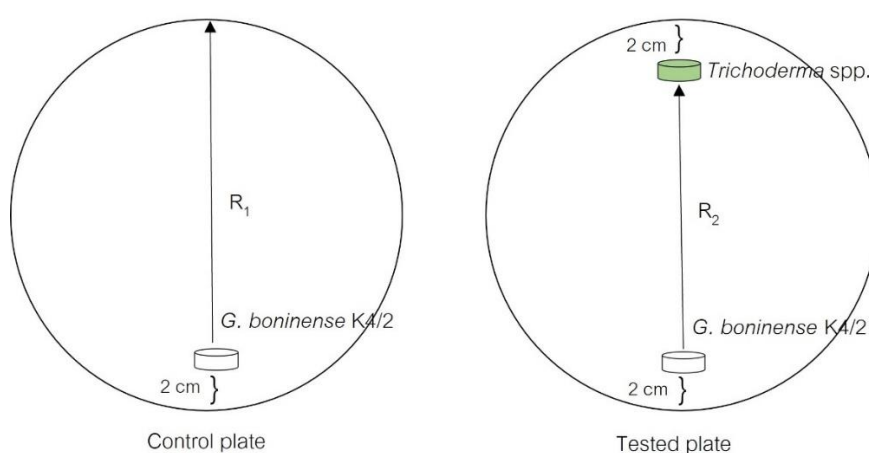
เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ใช้เป็นเชื้อ *Trichoderma* spp. 4 ไส้หลอด ดังนี้คือ *Trichoderma* sp. Z2-02, *T. asperellum* K1-02, *T. asperellum* T76-14 และ *Trichoderma* sp. Trg3-8 โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะขึ้นรู้นเชื้อ *Trichoderma* ที่ต้องการทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ และเชื้อ *G. orbiforme* K4/2 วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยวิธี dual culture ซึ่งวางเชื้อทั้งสองในทิศตรงข้ามกันห่างจากขอบจานเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร ส่วนชุดควบคุมจะวางเชื้อ *G. orbiforme* K4/2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เพียงเชื้อเดียว โดยวางห่างจากขอบจานเลี้ยงเชื้อ 2

เซนติเมตร (ภาพที่ 7) บ่มที่อุณหภูมิ $28 \pm 2^\circ \text{C}$ เป็นเวลา 5–7 วัน ทำการทดสอบทั้งหมด 5 ซ้ำ และหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อตามสมการ (Sundram, 2013)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = [(R_1 - R_2) / R_1] \times 100$$

R_1 = รัศมีของเส้นใยของเชื้อราในชุดควบคุม (control)

R_2 = รัศมีของเส้นใยของเชื้อราไปยังจุดของเชื้อปฏิปักษ์



ภาพที่ 7 การทดสอบกลไกการแก่งแย่งแข่งขันระหว่างเชื้อ *Trichoderma* spp. ต่อเชื้อ *Ganoderma orbiforme* K4/2 ด้วยวิธี dual culture

2.3.2 การทดสอบกลไกการทำลายชีวิต (antibiosis)

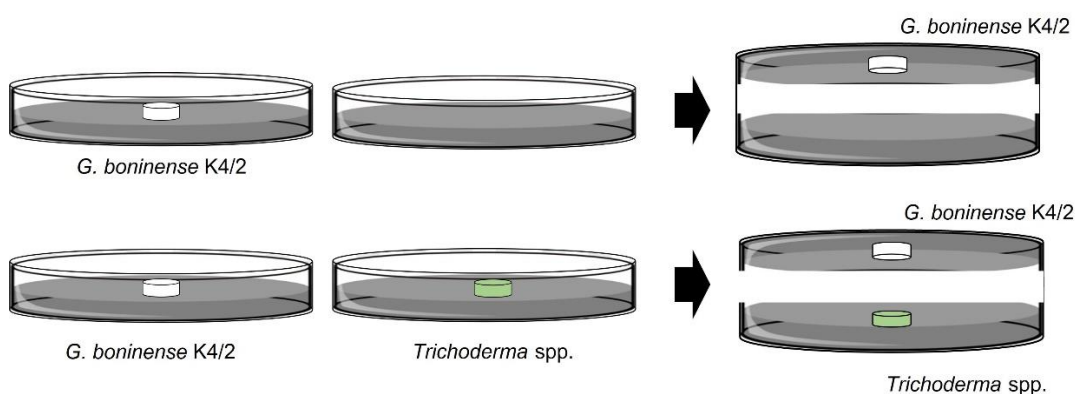
2.3.2.1 สารระเหยของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (volatile antifungal bioassay)

ทดสอบผลของสารระเหยระหว่างเชื้อ *Trichoderma* spp. ต่อเชื้อ *G. orbiforme* K4/2 ด้วยวิธี sealed plate (Dennis and Webster, 1971) เจาะชิ้นวุ้นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้จากการทดสอบที่ 2.6 และเชื้อ *G. orbiforme* K4/2 ด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยวางตรงกลางของจานเลี้ยงเชื้อ แล้วนำจานเลี้ยงเชื้อทั้งสองประกบแล้วพันด้วยพาราฟิล์ม ส่วนชุดควบคุมใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะชิ้นวุ้นของเชื้อ *G. orbiforme* K4/2 วางตรงกลางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จากนั้นนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อเปล่ามาประกบแล้วพันด้วยพาราฟิล์ม (ภาพที่ 8) ทำการทดสอบกรรมวิธีละ 5 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ $28 \pm 2^\circ \text{C}$ เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อ *G. orbiforme* K4/2 และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งตามสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = [(Dc - Dt) / Dc] \times 100$$

Dc = เส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อราสาเหตุโรคในชุดควบคุม

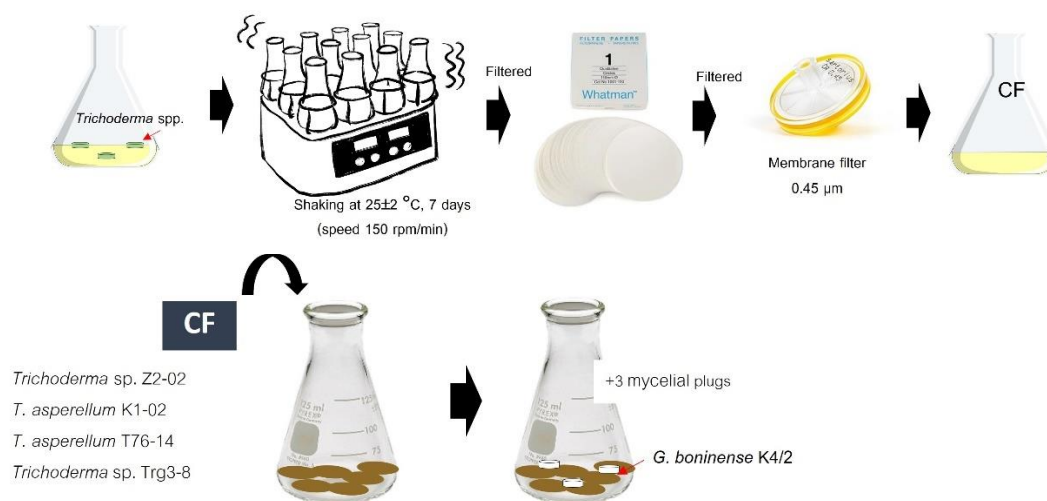
Dt = เส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อราสาเหตุโรคที่ทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์



ภาพที่ 8 การทดสอบการสร้างสารระเหยของเชื้อ *Trichoderma* spp. ต่อเชื้อ *Ganoderma orbiforme* K4/2 ด้วยวิธี sealed plate

2.3.2.2 การทดสอบน้ำคั้นเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (cell – free culture filtrate; CF)

หลังจากคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากกว่า 70% (จากการทดสอบที่ 5.1) นำเชื้อดังกล่าวมาทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะ หรือสารพิษในอาหารเหลว โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะชิ้นวุ้น แล้วนำชิ้นวุ้นเดิมลงในอาหาร potato dextrose broth (PDB) จำนวน 3 ชิ้น/ขวด นำไปแช่ที่อุณหภูมิห้อง (25 ± 2 °C) เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และกรองต่อด้วย membrane filter ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร (Shakeri and Foster, 2007) เพื่อให้ได้ CF ที่ใช้ในการทดสอบ เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (จากการทดลองที่ 1.1 และ 1.2) ปิดฝาขวดด้วยฟอยล์อะลูมิเนียม แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ แล้วเติม CF 8 มิลลิลิตร ลงในอาหารแบบแข็ง จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะชิ้นวุ้นของเชื้อ *G. orbiforme* K4/2 วางบนอาหารแบบแข็งจำนวน 3 ชิ้น/ขวด (ภาพที่ 9) กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม (จากการทดลองที่ 1.3) จากนั้นสกัดเอนไซม์แบบหยาบ เพื่อนำไปวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส ลิกนินเปอร์ออกซิเดส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส



ภาพที่ 9 การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเชื้อเลี้ยง *Trichoderma* spp. ต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อ *Ganoderma orbiforme* K4/2

3. การทดสอบปัจจัยทางกายภาพ และเคมีที่มีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน

นำเอนไซม์สกัดหยาบที่รู้ค่ากิจกรรมเริ่มต้น (initial activity; ia) ที่ได้มาจากการเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งมาทดสอบร่วมกับปัจจัยทางกายภาพ และเคมี

3.1 ปัจจัยทางกายภาพ

3.1.1 อิทธิพลของอุณหภูมิ

นำเอนไซม์สกัดหยาบที่รู้ค่ากิจกรรมเริ่มต้นเติมลงในหลอดเซนติฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มด้วยเครื่องให้ความร้อนหลอดทดลอง (heating block) รุ่น MD-MINI (Major Science, Taiwan) ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ดังนี้ คือ 40, 50, 60 และ 70 °C (Snajdr and Baldrian, 2007) (แต่ละกรรมวิธีทำ 3 ซ้ำ) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส ลิกนินเปอร์ออกซิเดส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่เหลืออยู่ (remaining activity) เทียบกับค่ากิจกรรมเริ่มต้น

3.1.2 อิทธิพลของเวลาในการบ่มเชื้อ

นำเอนไซม์สกัดหยาบที่รู้ค่ากิจกรรมเริ่มต้นเติมลงในหลอดเซนติฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร โดยบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม (จากการทดลองที่ 3.1.1) ด้วยเครื่องให้ความร้อนหลอดทดลอง รุ่น MD-MINI (Major Science, Taiwan) เป็นเวลาดังนี้ คือ 2, 3, 4, 5 และ 6 ชั่วโมง (Vandana et al., 2019) (แต่ละกรรมวิธีทำ 3 ซ้ำ) หลังจากนั้นนำไปวัดค่า

กิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส ลิกนินเปอร์ออกซิเดส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่เหลืออยู่เทียบกับค่ากิจกรรมเริ่มต้น

3.1.3 อิทธิพลของแสง

นำเอนไซม์สกัดหยาบที่รู้ค่ากิจกรรมเริ่มต้นเดิมลงในหลอดเซนติฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาทดสอบผลของแสงโดยบ่มในที่มืด ที่มีแสง LED ที่มีแสง LED สลับกับที่มืด และแสงสีฟ้า (Zhang and Tang, 2008) แต่ละกรรมวิธีทำ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส ลิกนินเปอร์ออกซิเดส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่เหลืออยู่เทียบกับค่ากิจกรรมเริ่มต้น

3.2 ปัจจัยทางเคมี

3.2.1 อิทธิพลของธาตุอาหาร

นำเอนไซม์สกัดหยาบที่รู้ค่ากิจกรรมเริ่มต้นเดิมลงในหลอดเซนติฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร แล้วเติมธาตุอาหาร ammonium sulphate ที่ความเข้มข้น 2.0, 2.5 และ 3.0%, boric acid ที่ความเข้มข้น 0.08, 0.24 และ 0.4%, calcium chloride ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.6 และ 1.0%, copper sulfate ที่ความเข้มข้น 0.03, 0.09 และ 0.15%, dipotassium phosphate ที่ความเข้มข้น 0.7, 1.25 และ 1.8%, ferrous sulphate ที่ความเข้มข้น 0.002, 0.0035 และ 0.005%, magnesium sulphate ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.45 และ 0.7%, manganese sulfate ที่ความเข้มข้น 0.0025, 0.02125 และ 0.04%, phosphoric acid ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.3% และ zinc sulfate ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.45 และ 0.8% (Fairhurst and Mutert, 1999) ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ส่วนชุดควบคุมเติมเอนไซม์สกัดหยาบในหลอดเซนติฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 0.25 มิลลิลิตร (แต่ละกรรมวิธีทำ 3 ซ้ำ) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส ลิกนินเปอร์ออกซิเดส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

3.2.2 อิทธิพลของสารประกอบฟีนอลิก

นำเอนไซม์สกัดหยาบที่รู้ค่ากิจกรรมเริ่มต้นเดิมลงในหลอดเซนติฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร แล้วเติมสารประกอบฟีนอลิก azure B, guaiacol, phenol และ salicylic acid ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 30 mM (Bivi *et al.*, 2016; Surendran *et al.*, 2018) ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ส่วนชุดควบคุมเติมเอนไซม์สกัดหยาบในหลอดเซนติฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 0.25 มิลลิลิตร (แต่ละกรรมวิธีทำ 3 ซ้ำ)

บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส ลิกนิน เพอร์ออกซิเดส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

3.2.3 อิทธิพลของกรดอินทรีย์

นำเอนไซม์สกัดหยาบที่รู้ค่ากิจกรรมเริ่มต้นเติมลงในหลอดเซนติฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร แล้วเติมกรดอินทรีย์ acetic acid, citric acid และ lactic acid ที่มีความเข้มข้น 0, 20, 40, 60 และ 80 mM (Jo *et al.*, 2009) ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ส่วนชุดควบคุมเติมเอนไซม์สกัดหยาบในหลอดเซนติฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 0.25 มิลลิลิตร (แต่ละกรรมวิธีทำ 3 ซ้ำ) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส ลิกนินเพอร์ออกซิเดส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

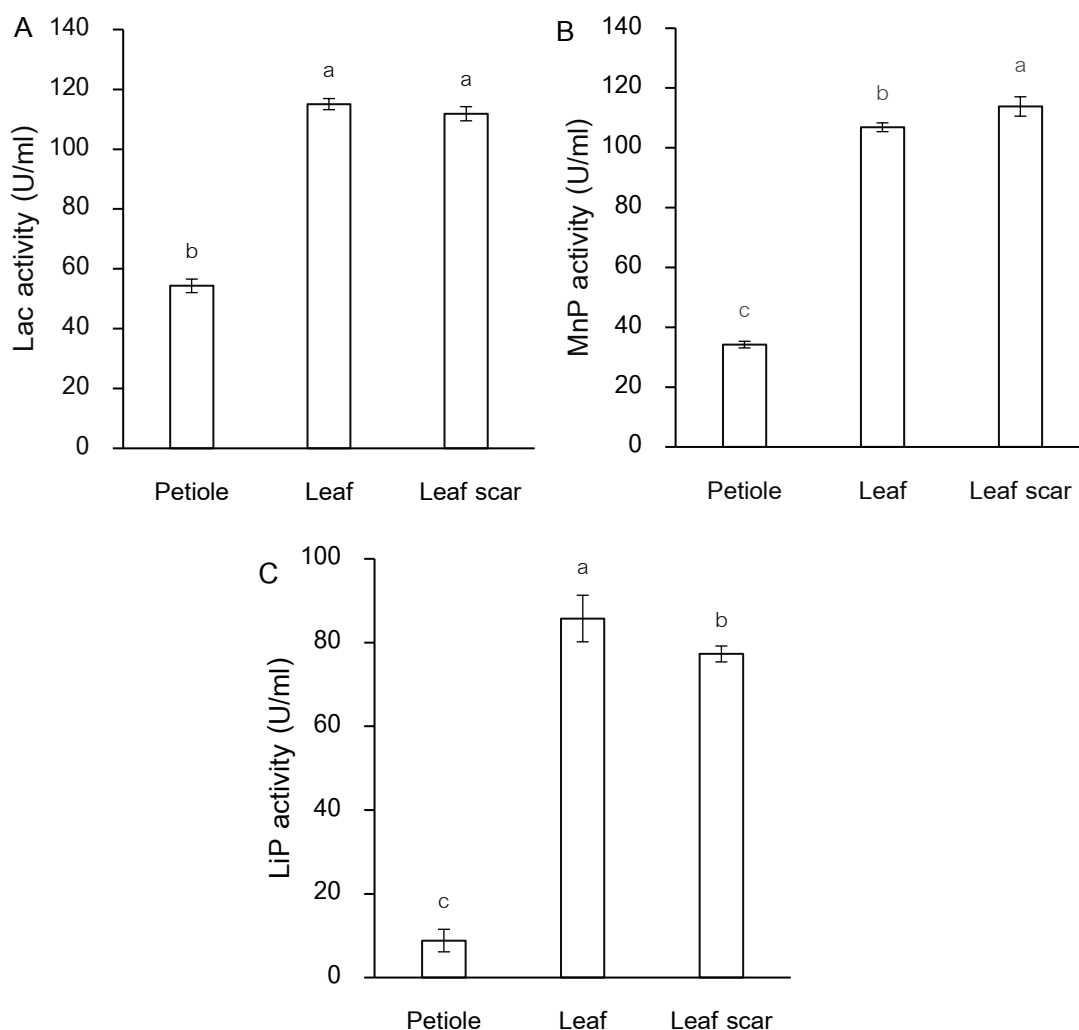
บทที่ 4

ผลการทดลอง และวิจารณ์ผล

1. สภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *Ganoderma orbiforme* K4/2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง

1.1 การคัดเลือกวัสดุ (substrate) ในการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแข็ง

จากการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแบบแข็งที่มีวัสดุเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ กาบใบ (leaf scar) ทางใบ (petiole) และใบ (leaf) ของปาล์มน้ำมัน พบว่าการเลี้ยงเชื้อด้วยกาบใบ และใบไม่ทำให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 10A) แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อด้วยกาบใบทำให้เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสมีค่ากิจกรรมสูงที่สุด (113.83 ยูนิต/มิลลิลิตร) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับทางใบ และใบที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ 34.22 และ 106.89 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 10B) และเมื่อเลี้ยงเชื้อด้วยใบของปาล์มน้ำมันพบว่าเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสมีค่ากิจกรรมสูงที่สุด (85.74 ยูนิต/มิลลิลิตร) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกาบใบ และทางใบที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ 77.28 และ 8.83 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 10C) จากการศึกษาเพิ่มเติมพบว่าเชื้อรากลุ่มราผุสีขาว (white rot fungi) สามารถหลั่งเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และออกซิเดสเพื่อย่อยสลายลิกนินได้ (Bugg *et al.*, 2011) และจากรายงานของ Ikubar และคณะ (2018) พบว่าใบปาล์มน้ำมัน (oil palm frond) มากกว่า 70% ของต้นปาล์มน้ำมันไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ แต่สามารถใช้เป็นวัสดุในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์แบบหมัก (fermentation) ได้เนื่องจากมีปริมาณลิกนินมากถึง 26% (Abdul Khalil *et al.*, 2008; Adela *et al.*, 2014) ดังนั้นจากการทดลองนี้จึงเลือกใบของปาล์มน้ำมันเป็น substrate ในการเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง

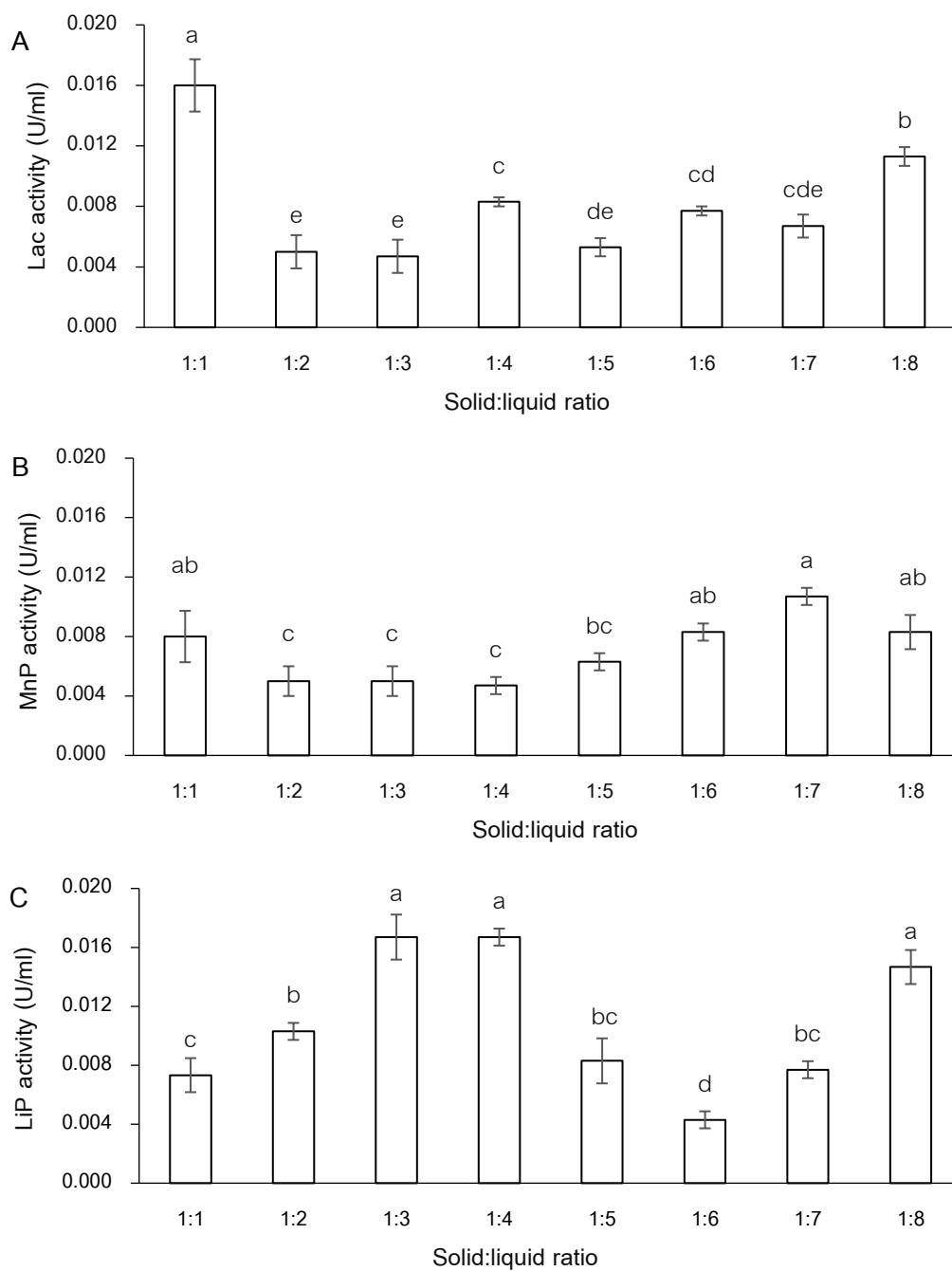


ภาพที่ 10 วัสดุเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อรา *Ganoderma orbiforme* K4/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (กราฟแท่งคือค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ และตัวอักษรที่กำกับเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$))

1.2 อัตราส่วนระหว่างของแข็งต่อของเหลวในการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแบบแข็ง

จากการทดสอบอัตราส่วนระหว่างของแข็งและของเหลว (S:L) ที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อรา *G. orbiforme* K4/2 พบว่าอัตราส่วน 1:1 ทำให้เชื้อรา *G. orbiforme* K4/2 ผลิตเอนไซม์แลคเคสสูงที่สุดโดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 0.016 ยูนิต/มิลลิลิตร ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองทั้งหมด โดยอัตราส่วน 1:8 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสรองลงมา (0.011 ยูนิต/มิลลิลิตร) ตามด้วยอัตราส่วน 1:4, 1:6 และ 1:7 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสเท่ากับ 0.0083, 0.0077 และ 0.0067 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่

11A) อัตราส่วน 1:1, 1:6, 1:7 และ 1:8 ทำให้เชื้อรา *G. orbiforme* K4/2 ผลิตเอนไซม์แอมงานีสเปอร้ออกซิเดสได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 0.010, 0.0083, 0.011 และ 0.0083 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 11B) และอัตราส่วน 1:3, 1:4 และ 1:8 ทำให้เชื้อรา *G. orbiforme* K4/2 ผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร้ออกซิเดสได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 0.0167, 0.0167 และ 0.0127 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 11C) จากรายงานของ Li และคณะ (2022) ที่เลี้ยงเชื้อ *Pleurotus ostreatus* ในฟางข้าวซึ่งใช้อัตราส่วน 1:2, 1:3, 1:4 และ 1:5 (solid: liquid ratio) พบว่าสามารถย่อยสลายลิกนินได้ไม่แตกต่างกัน ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาในครั้งนี้ ซึ่งเชื้อราแต่ละชนิดสามารถเจริญได้ดีในอัตราส่วนของแข็ง:ของเหลวที่แตกต่างกัน (Zadrazil and Brunnert, 1981) และเมื่อมีความชื้นเพียงพอ ก็จะส่งผลดีต่อการทำงานของเอนไซม์ (Amorim *et al.*, 2017) ดังนั้นจากการทดลองนี้จึงเลือกอัตราส่วน 1:8 เป็นอัตราส่วนที่ใช้ในการทดลองต่อ ๆ ไป

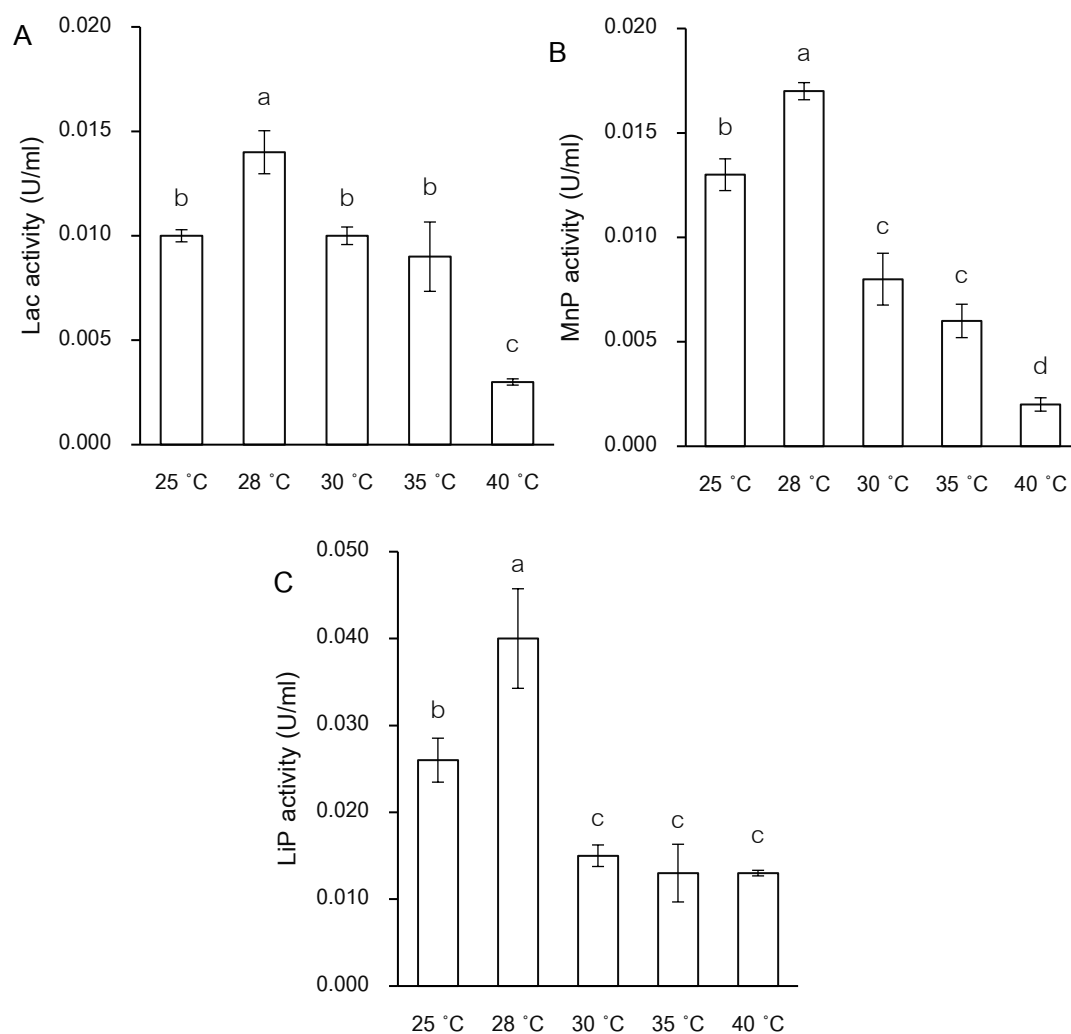


ภาพที่ 11 อัตราส่วนระหว่างของแข็ง/ของเหลวที่เหมาะสมบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อรา *Ganoderma orbiforme* K4/2 (กราฟแท่งคือค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ และตัวอักษรที่กำกับเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$))

1.3 อุณหภูมิในการบ่มเชื้อ

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อรา *G. orbiforme* K4/2 ในสภาพอาหารแบบแข็งคือ 28 °C โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และลิกนินเปอร์ออกซิเดส สูงสุดเท่ากับ 0.014, 0.017 และ 0.040 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 12) ซึ่งมีความแตกต่างกับอุณหภูมิอื่น ๆ ที่ทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และเมื่ออุณหภูมิ 30 °C ส่งผลให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และลิกนินเปอร์ออกซิเดสลดลง

จากรายงานของ Hariharan และ Nambisan (2013) ที่เลี้ยงเชื้อรา *G. lucidum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งที่อุณหภูมิ 23–33 °C พบว่ามีค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และลิกนินเปอร์ออกซิเดสสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 27 °C และ Luangharn และคณะ (2019) รายงานว่าอุณหภูมิ 25–28 °C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเส้นใยของเชื้อ *G. tropicum* ส่วนอุณหภูมิที่สูงกว่า 30 °C ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเส้นใย เช่นเดียวกับรายงานของ Jonathan และคณะ (2004) ที่รายงานว่าอุณหภูมิ 45 และ 50 °C สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้สอดคล้องกับการทดลองในครั้งนี้ที่พบว่าเส้นใยของเชื้อ *G. orbiforme* K4/2 เจริญได้ที่อุณหภูมิ 28 °C และมีการเจริญลดลงที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นต้นไป

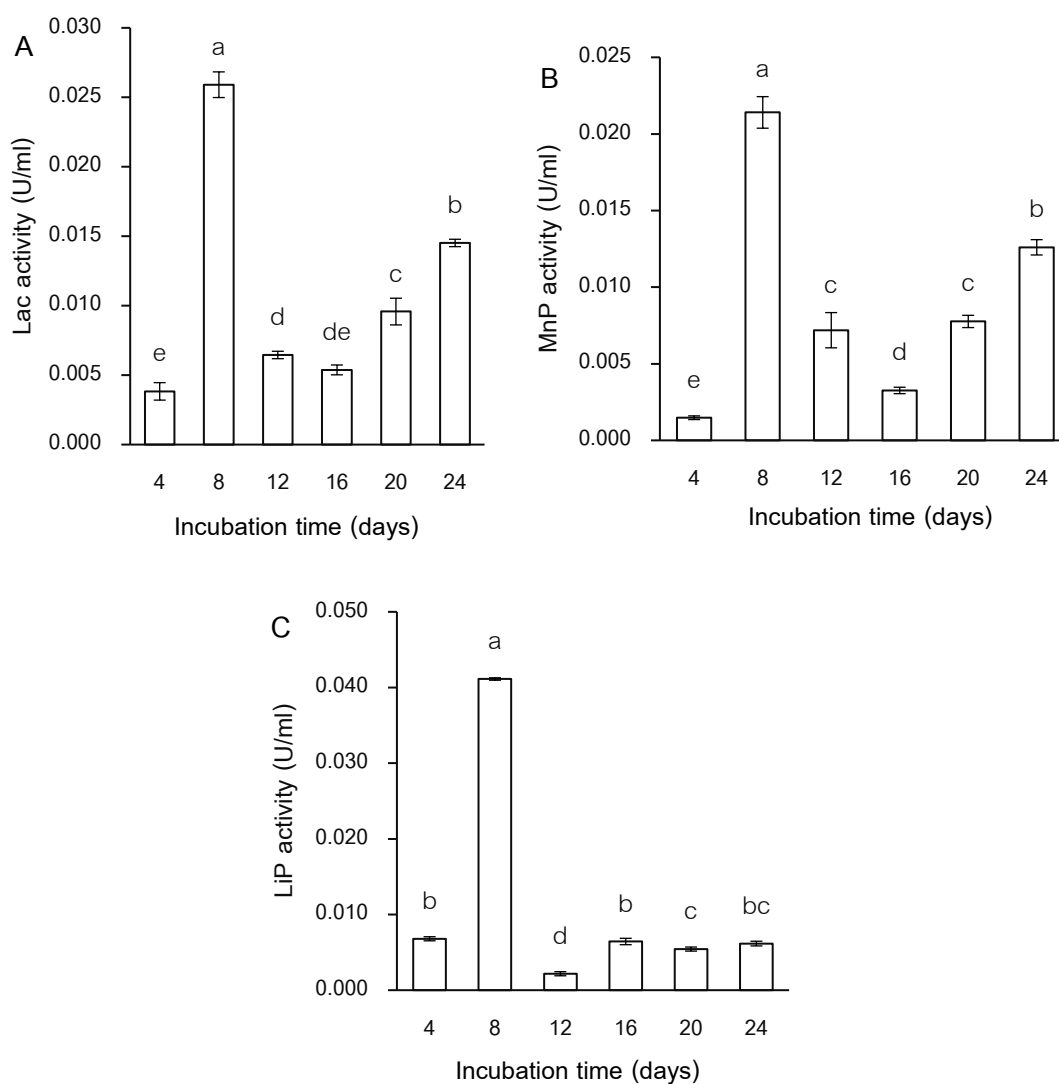


ภาพที่ 12 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อรา *Ganoderma orbiforme* K4/2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (กราฟแท่งคือค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ และตัวอักษรที่กำกับเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$))

1.4 ระยะเวลาในการบ่มเชื้อ

ระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเชื้อรา *G. orbiforme* K4/2 ที่เลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแบบแข็ง คือ 8 วัน โดยทำให้เอนไซม์แลคเคส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และลิกนินเปอร์ออกซิเดสมีค่ากิจกรรมเท่ากับ 0.026, 0.021 และ 0.041 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองอื่น ๆ (ภาพที่ 13) สอดคล้องกับรายงานของ Goh และคณะ (2016) ที่เลี้ยงเชื้อรา *G. boninense* เป็นเวลา 8–9 วันพบว่าเส้นใยของเชื้อเจริญได้ดีที่สุด และสามารถผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสได้มากขึ้นหลังจากเลี้ยงเชื้อ

ราเป็นเวลา 7 วัน แต่ทั้งนี้ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อราในกลุ่มราผู้สีขาว (Mehboob *et al.*, 2011)

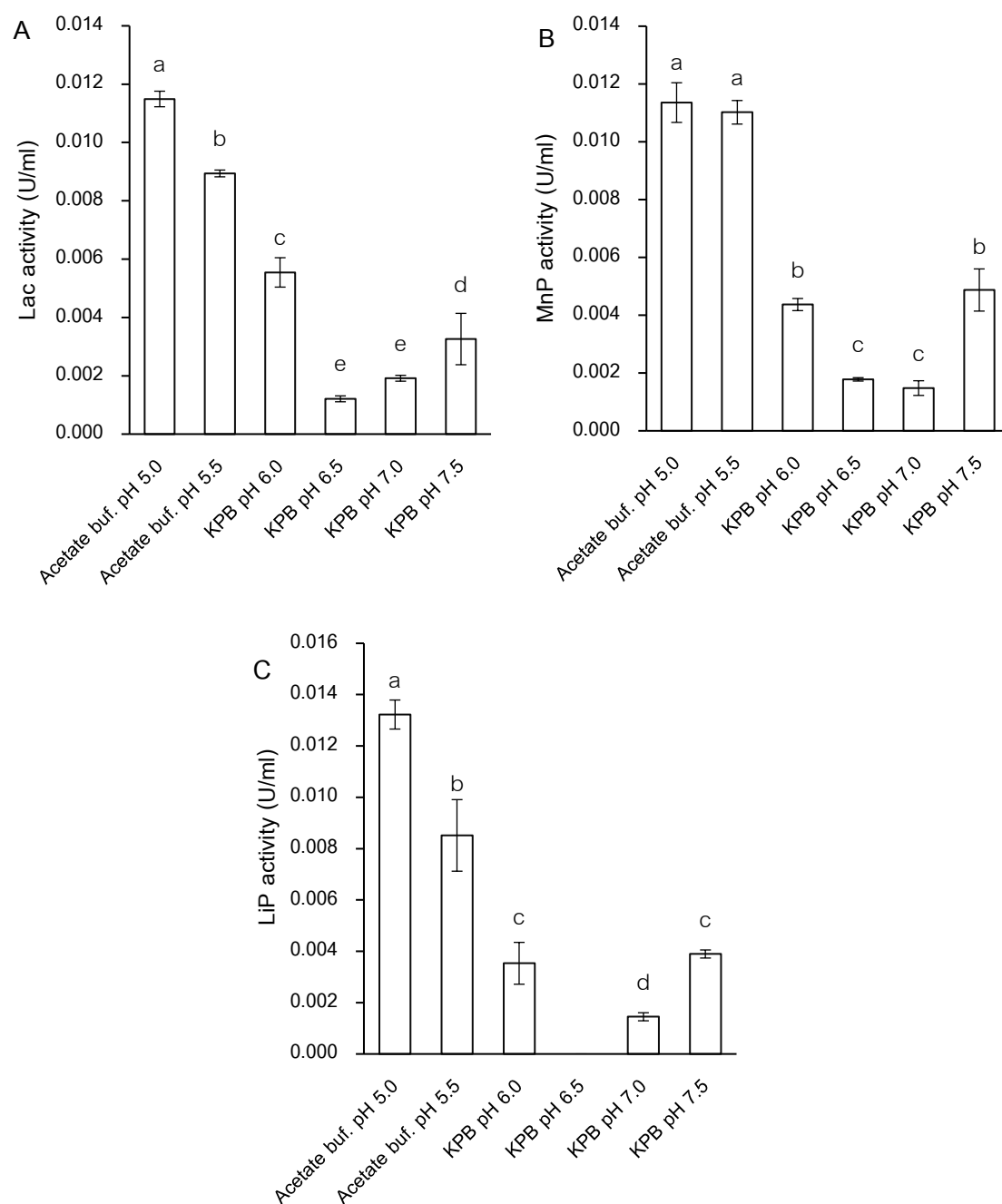


ภาพที่ 13 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อรา *Ganoderma orbiforme* K4/2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (กราฟแท่งคือค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ และตัวอักษรที่กำกับเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$))

1.5 บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมเพื่อใช้สกัดสารละลายเอนไซม์แบบหยาบ

จากการทดสอบ acetate buffer (pH 5.0 และ 5.5) และ potassium phosphate buffer (pH 6.0, 6.5 และ 7.0) พบว่าเมื่อใช้ acetate buffer pH 5.0 ในการสกัดสารละลายเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์แลคเคส และลิกนินเปอร์ออกซิเดสมีค่ากิจกรรมเท่ากับ 0.011 และ 0.013 ยูนิต/มิลลิลิตร

ตามลำดับ (ภาพที่ 12A และ 12C) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับบัฟเฟอร์ pH อื่น ๆ และพบว่า acetate buffer pH 5.0 และ 5.5 ทำให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 12B) จากรายงานของ Manavalan และคณะ (2015) Alam และคณะ (2009) และ Mathur และคณะ (2021) ชี้ให้เห็นว่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ลิกลินเปอร์ออกซิเดส และแลคเคสที่ผลิตโดยเชื้อรา *G. lucidum* และ *Phanerochaete chrysosporium* คือ pH 5.0 และ 5.5 สอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่าเอนไซม์แลคเคส ลิกลินเปอร์ออกซิเดส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสทำงานได้ดีที่ pH 5.0 และ 5.5



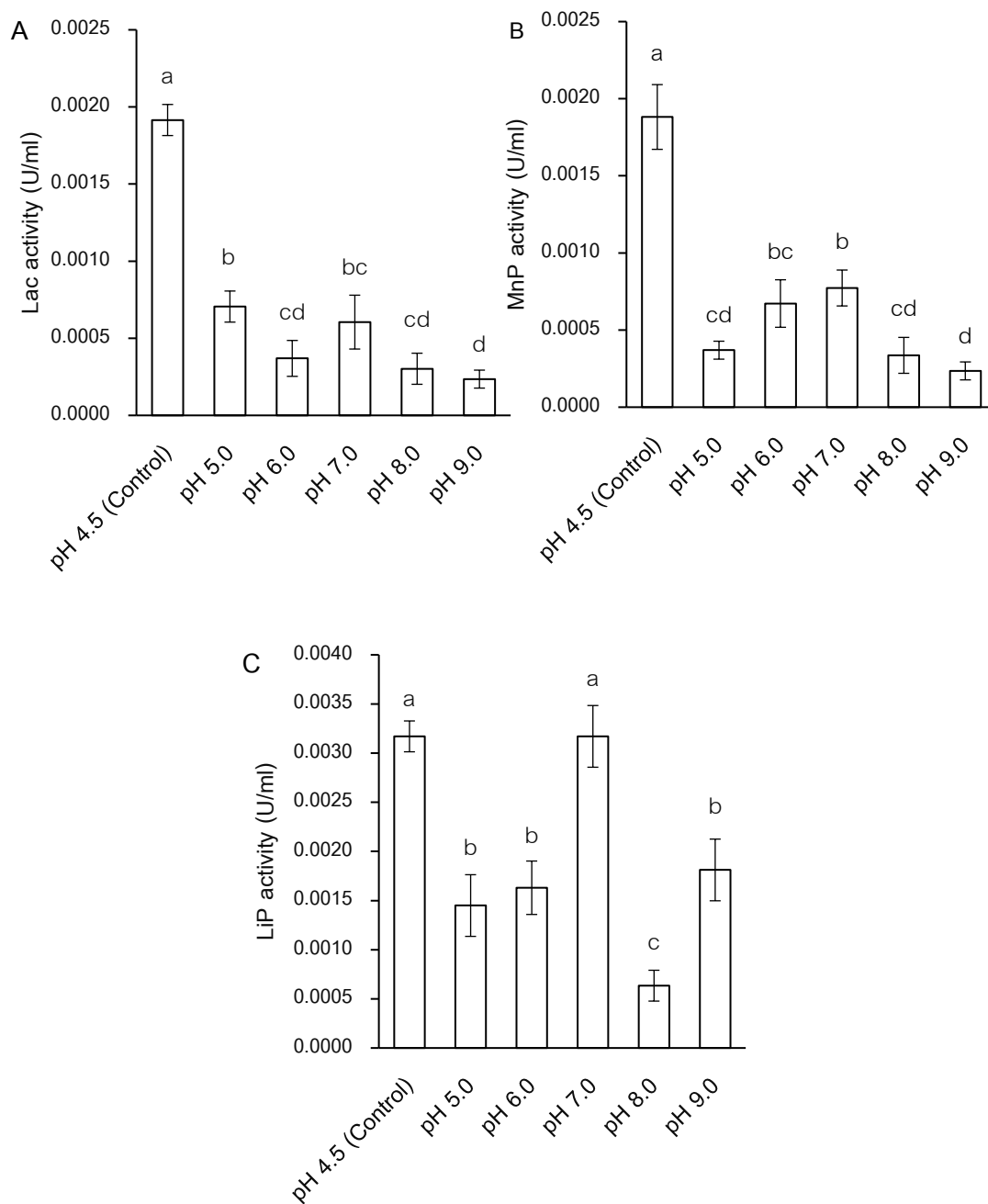
ภาพที่ 14 บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการสกัดยับเอนไซม์ย่อยสลายลินินที่เชื้อรา *Ganoderma orbiforme* K4/2 ผลิตขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (กราฟแท่งคือค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ และตัวอักษรที่กำกับเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$))

2. ปัจจัยทางกายภาพ เคมี และชีวภาพที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อรา *Ganoderma orbiforme* K4/2

2.1 อิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของของเหลวในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการทดสอบความเป็นกรด-ด่างของของเหลวในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งพบว่า pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 ส่งผลให้เชื้อรา *G. orbiforme* K4/2 ผลิตเอนไซม์แลคเคส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (pH 4.5) โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสเท่ากับ 0.00071, 0.00037, 0.0006, 0.0003 และ 0.00024 ยูนิต/มิลลิลิตร (ภาพที่ 15A) และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสเท่ากับ 0.00037, 0.00067, 0.00077, 0.00034 และ 0.00024 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 15B) และพบว่าที่ pH 5.0, 6.0, 8.0 และ 9.0 ส่งผลให้เชื้อรา *G. orbiforme* K4/2 ผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสเท่ากับ 0.00145, 0.00163, 0.00063 และ 0.00181 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (0.003 ยูนิต/มิลลิลิตร) แต่พบว่าที่ pH 7.0 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสมีค่ากิจกรรมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ภาพที่ 15C)

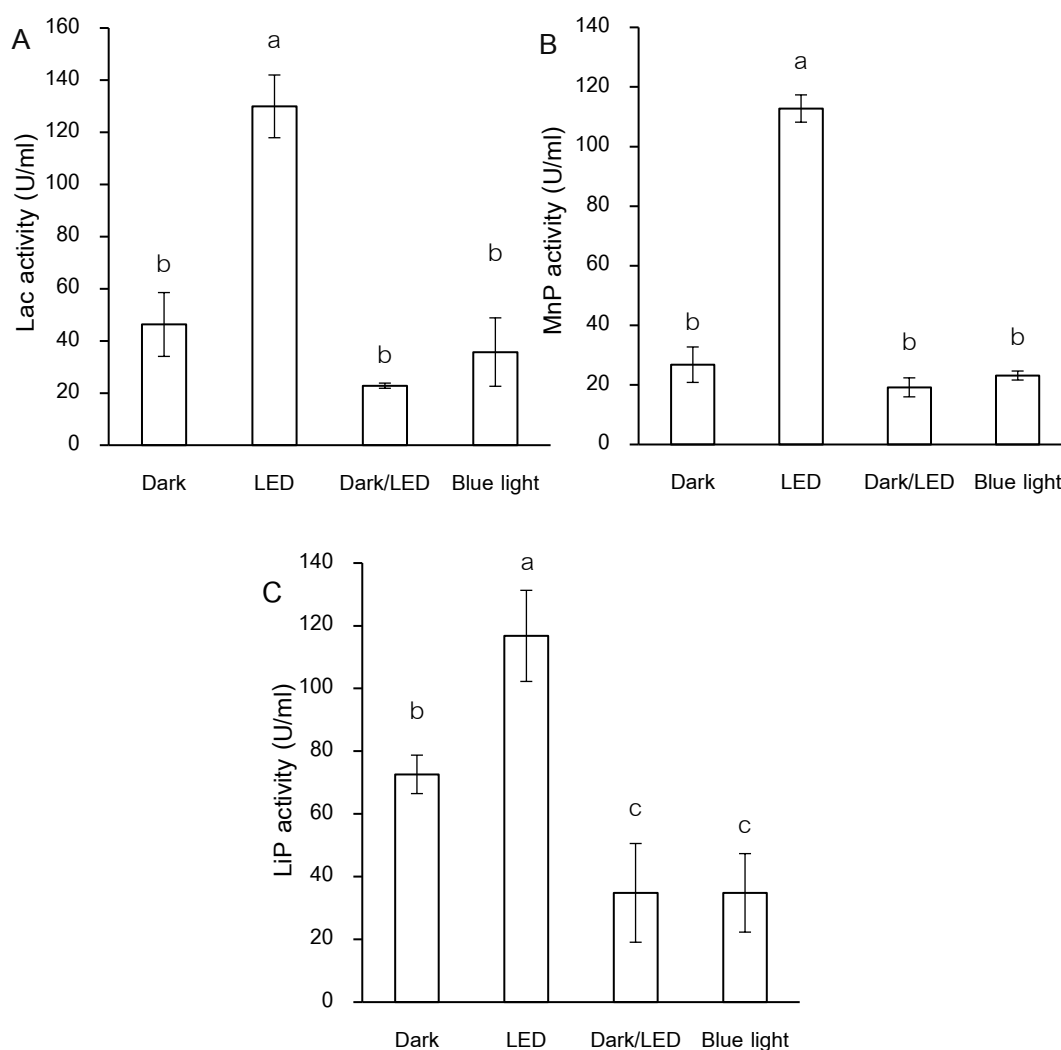
เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีน ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของ pH จึงส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา (Sivaramanan, 2014) จากการศึกษาของ Surendran และคณะ (2018) เอนไซม์ย่อยสลายลิกนินทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด หรือใกล้เคียงกรด ดังนั้นการปรับ pH ให้มีความเป็นด่างมากขึ้นจึงช่วยลดการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินได้ ซึ่งจากรายงานของ Sun และคณะ (2013) ค่า pH ที่เพิ่มขึ้นจะรบกวนการถ่ายโอนอิเล็กตรอนทำให้เอนไซม์หยุดทำงาน สอดคล้องกับการศึกษาที่พบว่าเชื้อ *G. orbiforme* K4/2 ผลิตเอนไซม์แลคเคส และเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสลดลงเมื่อค่า pH เพิ่มขึ้น แต่จากการทดลองนี้ที่ pH 7.0 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสไม่ลดลง ซึ่งโดยทั่วไปเชื้อราในกลุ่มราผู้สีขาวจะอาศัยอยู่ในที่มี pH เป็นกลาง (Kresnawaty *et al.*, 2018) ดังนั้นที่ pH 7.0 อาจพบการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินได้



ภาพที่ 15 ความเป็นกรด-ด่างของของเหลวต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินที่เชื้อรา *Ganoderma orbiforme* K4/2 ผลิตขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (กราฟแท่งคือค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ และตัวอักษรที่กำกับเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$))

2.2 อิทธิพลของแสงในการเลี้ยงเชื้อ

จากการทดสอบอิทธิพลของแสงพบว่าการเลี้ยงในที่มืด ที่มีดสลับกับการให้แสง LED และภายใต้แสงสีฟ้าส่งผลให้เชื้อรา *G. orbiforme* K4/2 ผลิตเอนไซม์แลคเคส แมกานีสเปอร์ออกซิเดส และลิกนินเปอร์ออกซิเดสลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ การเลี้ยงภายใต้แสง LED ซึ่งเอนไซม์แลคเคสมีค่ากิจกรรมเท่ากับ 129.95 ยูนิต/มิลลิลิตร (ภาพที่ 16A) เอนไซม์แอมกานีสเปอร์ออกซิเดสมีค่ากิจกรรมเท่ากับ 112.76 ยูนิต/มิลลิลิตร (ภาพที่ 16B) และ เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสมีค่ากิจกรรมเท่ากับ 116.78 ยูนิต/มิลลิลิตร (ภาพที่ 16C) สอดคล้องกับรายของ Magday และคณะ (2014) ที่เลี้ยงเชื้อ *G. lucidum* ในสภาพที่มีแสง LED และในที่มืด พบว่าการเลี้ยงเชื้อในสภาพที่มีแสง LED เส้นใยของเชื้อเจริญได้ดีกว่าในที่มืด และจากรายงานของ Zhang และ Tang (2008) ที่เลี้ยงเชื้อ *G. lucidum* ภายใต้แสงต่าง ๆ พบว่าภายใต้แสงสีฟ้า ทำให้เส้นใยมีการเจริญลดลง เพราะแสงสีฟ้าสามารถยับยั้งการผลิตสารออกซิเดชันภายในเซลล์ เช่น isoamyl alcohol oxidase และ thioredoxin peroxidase (Rosales-Saavedra *et al.*, 2006)



ภาพที่ 16 การเลี้ยงเชื้อภายใต้แสงต่าง ๆ ต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อรา *Ganoderma orbiforme* K4/2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (กราฟแท่งคือค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ และตัวอักษรที่กำกับเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$))

2.3 อิทธิพลของธาตุอาหาร

ธาตุอาหารเกือบทุกชนิดที่ทดสอบในงานวิจัยครั้งนี้สามารถยับยั้งการผลิตเอนไซม์แลคเคส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และลิกนินเปอร์ออกซิเดสของเชื้อรา *G. orbiforme* K4/2 ได้ ยกเว้นเพียง K_2HPO_4 ที่ความเข้มข้น 0.7 และ 1.25% (w/v) ที่ส่งผลให้เชื้อรา *G. boninense* K4/2 ผลิตเอนไซม์แลคเคสได้ 42.14 ± 0.20 และ $46.98 \pm 0.27 \times 10^{-3}$ ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ สูงกว่าชุดควบคุมที่มีค่ากิจกรรมเท่ากับ $12.60 \pm 0.17 \times 10^{-3}$ ยูนิต/มิลลิลิตร และการเติม K_2HPO_4 ความเข้มข้น 0.7, 1.25 และ 1.8% (w/v) และ $ZnSO_4$ 0.8% (w/v) ลงในอาหารแบบแข็งจะส่งผลให้เชื้อรา

G. orbiforme K4/2 ผลิตเอนไซม์แอมงานีสเปอร์ออกซิเดสได้เพิ่มขึ้นที่สูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ในทำนองเดียวกันกับเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่พบว่า การเติม K_2HPO_4 ทั้ง 3 ความเข้มข้นส่งผลให้เชื้อรา *G. orbiforme* K4/2 ผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสได้เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ตารางที่ 2)

ธาตุอาหารรอง (micronutrient) เป็นสารอาหารที่พืชต้องการเพียงเล็กน้อย แต่ขาดไม่ได้ เพราะธาตุอาหารบางชนิดส่งผลต่อกิจกรรมของจุลินทรีย์ และการทำงานของเอนไซม์ในเซลล์ของพืช (Atefeh *et al.*, 2010; Ogeh *et al.*, 2021) ธาตุอาหารรอง เช่น โบรอน (Br) แมงกานีส (Mn) สังกะสี (Zn) ทองแดง (Cu) เหล็ก (Fe) และคลอรีน (Cl) สามารถลดความรุนแรงของการเกิดโรคได้โดยการกระตุ้นกลไกการป้องกันตัวเองของพืช (Siddiqui *et al.*, 2015) นอกจากนี้ Tejirian และ Xu (2010) รายงานว่าเหล็ก สังกะสี และแมงกานีสสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ย่อยเซลลูโลสซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์พืช สอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่า Br, Cu, Cl, Fe, Mn และ Zn สามารถยับยั้งการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อ *G. orbiforme* K4/2 และจากรายงานของ Rakib และคณะ (2017) พบว่าทองแดง และสังกะสีในใบปาล์มน้ำมันที่ต่ำกว่ามาตรฐานสามารถทำให้พบการเกิดโรคจากเชื้อรา *Ganoderma* sp. ได้

ตารางที่ 2 ผลของธาตุอาหารต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อรา *Ganoderma orbiforme* K4/2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง

Treatment	Concentration (%)	Enzyme activity ($\times 10^{-3}$ U/ml) ^{1/}		
		Lac	MnP	LiP
Control	-	12.60 $\pm$ 0.17c	9.11 $\pm$ 0.15e	27.63 $\pm$ 0.16d
CaCl ₂	0.2	2.39 $\pm$ 0.15o	1.48 $\pm$ 0.12tu	1.63 $\pm$ 0.27klmn
	0.6	5.31 $\pm$ 0.15hi	0.20 $\pm$ 0.10y	0.36 $\pm$ 0.16nop
	1.0	8.70 $\pm$ 0.15d	0.30 $\pm$ 0.10xy	1.27 $\pm$ 0.16klmnop
CuSO ₄	0.03	4.40 $\pm$ 0.15jk	4.17 $\pm$ 0.12mn	0.09 $\pm$ 0.16op
	0.09	1.51 $\pm$ 0.17qr	2.28 $\pm$ 0.15rs	0.09 $\pm$ 0.16op
	0.15	3.60 $\pm$ 0.06lm	7.39 $\pm$ 0.15g	0.00 $\pm$ 0.00p
FeSO ₄	0.002	2.39 $\pm$ 0.06o	2.45 $\pm$ 0.12qr	2.08 $\pm$ 0.42jklm
	0.0035	3.02 $\pm$ 0.10mn	4.67 $\pm$ 0.15kl	1.54 $\pm$ 0.31klmno
	0.005	5.11 $\pm$ 0.12i	4.40 $\pm$ 0.15lm	2.17 $\pm$ 0.27jkl
H ₃ BO ₃	0.08	1.18 $\pm$ 0.06r	0.40 $\pm$ 0.10wxy	0.09 $\pm$ 0.16op
	0.24	1.51 $\pm$ 0.10qr	1.65 $\pm$ 0.06t	0.00 $\pm$ 0.00p
	0.40	1.38 $\pm$ 0.15qr	0.64 $\pm$ 0.06wx	0.00 $\pm$ 0.00p
H ₃ PO ₄	0.1	5.81 $\pm$ 0.41gh	8.43 $\pm$ 0.12f	5.25 $\pm$ 0.16i
	0.2	2.59 $\pm$ 0.32no	2.72 $\pm$ 0.20pq	18.21 $\pm$ 1.18e
	0.3	3.56 $\pm$ 0.06lm	4.64 $\pm$ 0.10kl	9.69 $\pm$ 0.42h
K ₂ HPO ₄	0.7	42.14 $\pm$ 0.20b	43.41 $\pm$ 0.12a	38.59 $\pm$ 0.27c
	1.25	46.98 $\pm$ 0.27a	30.51 $\pm$ 0.15c	86.78 $\pm$ 1.85b
	1.8	7.93 $\pm$ 0.12e	31.96 $\pm$ 0.10b	94.29 $\pm$ 0.54a
MgSO ₄	0.2	6.72 $\pm$ 0.15f	6.69 $\pm$ 0.06h	19.02 $\pm$ 0.82e
	0.45	4.03 $\pm$ 0.17kl	3.12 $\pm$ 0.17op	11.23 $\pm$ 0.16g
	0.7	6.05 $\pm$ 0.10g	4.94 $\pm$ 0.10k	9.87 $\pm$ 0.16gh

ตารางที่ 2 ผลของธาตุอาหารต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อรา *Ganoderma orbiforme* K4/2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (ต่อ)

Treatment	Concentration (%)	Enzyme activity ($\times 10^{-3}$ U/ml) ^{1/}		
		Lac	MnP	LiP
MnSO ₄	0.0025	5.04 $\pm$ 0.44i	6.28 $\pm$ 0.06hi	0.00 $\pm$ 0.00p
	0.02125	5.14 $\pm$ 0.00i	5.98 $\pm$ 0.06i	1.45 $\pm$ 0.16klmnop
	0.04	4.91 $\pm$ 0.15ij	5.51 $\pm$ 0.06j	1.72 $\pm$ 0.16jklmn
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	2.0	1.78 $\pm$ 0.21pq	1.88 $\pm$ 0.15st	1.27 $\pm$ 0.16klmnop
	2.5	0.10 $\pm$ 0.00s	1.14 $\pm$ 0.12uv	3.17 $\pm$ 0.16j
	3.0	0.13 $\pm$ 0.06s	0.81 $\pm$ 0.10vw	2.63 $\pm$ 0.16jk
ZnSO ₄	0.1	2.25 $\pm$ 0.15op	3.19 $\pm$ 0.06o	0.72 $\pm$ 0.16lmnop
	0.45	2.55 $\pm$ 0.06no	3.97 $\pm$ 0.15n	0.63 $\pm$ 0.31mnop
	0.8	12.23 $\pm$ 0.15c	14.52 $\pm$ 0.17d	16.12 $\pm$ 0.63f

^{1/} ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในแนวดิ่งของตารางไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเปรียบเทียบโดย Tukey's HSD ($p>0.05$)

2.4 อิทธิพลของสารประกอบฟีนอลิก

จากการทดสอบสารประกอบฟีนอลิกพบว่า azure B, guaiacol และ phenol ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 30 mM ส่งผลให้เชื้อรา *G. orbiforme* K4/2 ผลิตเอนไซม์แลคเคส แเมกานีสเปอร์ออกซิเดส และลิกนินเปอร์ออกซิเดสลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ส่วน salicylic acid ที่ความเข้มข้น 20 และ 30 mM ส่งผลให้เชื้อรา *G. orbiforme* K4/2 ผลิตเอนไซม์แลคเคส แเมกานีสเปอร์ออกซิเดส และลิกนินเปอร์ออกซิเดสลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม guaiacol (ความเข้มข้น 10, 20 และ 30 mM), phenol และ salicylic acid (ความเข้มข้น 20 และ 30) ส่งผลให้เชื้อรา *G. orbiforme* K4/2 ผลิตเอนไซม์แลคเคสได้ น้อยที่สุดโดยมีค่ากิจกรรมอยู่ระหว่าง 0.00 ± 0.00 ถึง $0.17\pm 0.15 \times 10^{-3}$ ยูนิต/มิลลิลิตร ส่วน guaiacol (ความเข้มข้น 10, 20 และ 30 mM) และ salicylic acid (ความเข้มข้น 20 และ 30) ส่งผลให้เชื้อรา *G. orbiforme* K4/2 ผลิตเอนไซม์แเมกานีสเปอร์ออกซิเดสได้ลดลงโดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์อยู่ระหว่าง 0.00 ± 0.00 ถึง $0.27\pm 0.06 \times 10^{-3}$ ยูนิต/มิลลิลิตร นอกจากนี้ azure B และ guaiacol (ความเข้มข้น 10,

20 และ 30 mM), phenol และ salicylic acid (ความเข้มข้น 20 และ 30) ส่งผลให้เชื้อรา *G. orbiforme* K4/2 ผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสได้ลดลงโดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์อยู่ระหว่าง 0.00 ± 0.00 ถึง $0.27 \pm 0.27 \times 10^{-3}$ ยูนิต/มิลลิลิตร (ตารางที่ 3)

สารประกอบฟีนอลิกที่ความเข้มข้นสูงซึ่งสามารถยับยั้งค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสได้ (Souza *et al.*, 2004) ซึ่งมีรายงานว่า phenol ที่ความเข้มข้นสูงซึ่งจะมีความเป็นพิษส่งผลให้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *G. boninense* (Surendran *et al.*, 2017) และจากรายงานของ Surendran และคณะ (2018) ที่ศึกษาสารประกอบฟีนอลิกความเข้มข้น 1–25 mmol ที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อรา *G. boninense* พบว่า benzoic acid, salicylic acid และ syringic acid ความเข้มข้น 5 mmol สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใย และการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินได้

ตารางที่ 3 ผลของสารประกอบฟีนอลิกต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อรา *Ganoderma orbiforme* K4/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง

Treatment	Concentration (mM)	Enzyme activity ($\times 10^{-3}$ U/ml) ^{1/}		
		Lac	MnP	LiP
Control	0	8.30 $\pm$ 0.21b	6.22 $\pm$ 0.15b	2.81 $\pm$ 0.16b
Azure B	10	2.02 $\pm$ 0.10c	1.92 $\pm$ 0.10d	0.00 $\pm$ 0.00d
	20	1.11 $\pm$ 0.10d	1.21 $\pm$ 0.10f	0.27 $\pm$ 0.27d
	30	1.58 $\pm$ 0.50cd	2.35 $\pm$ 0.15c	0.18 $\pm$ 0.31d
Guaiacol	10	0.00 $\pm$ 0.00e	0.20 $\pm$ 0.10h	0.00 $\pm$ 0.00d
	20	0.10 $\pm$ 0.17e	0.00 $\pm$ 0.00h	0.00 $\pm$ 0.00d
	30	0.00 $\pm$ 0.00e	0.00 $\pm$ 0.00h	0.00 $\pm$ 0.00d
Phenol	10	1.18 $\pm$ 0.15d	1.58 $\pm$ 0.12e	1.54 $\pm$ 0.16c
	20	0.17 $\pm$ 0.15e	0.54 $\pm$ 0.06g	0.00 $\pm$ 0.00d
	30	0.17 $\pm$ 0.15e	0.27 $\pm$ 0.06gh	0.00 $\pm$ 0.00d
Salicylic acid	10	19.39 $\pm$ 0.15a	19.46 $\pm$ 0.10a	9.33 $\pm$ 0.16a
	20	0.00 $\pm$ 0.00e	0.00 $\pm$ 0.00h	0.00 $\pm$ 0.00d
	30	0.00 $\pm$ 0.00e	0.00 $\pm$ 0.00h	0.00 $\pm$ 0.00d

^{1/} ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในแนวดังของตารางไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเปรียบเทียบโดย Tukey's HSD ($p>0.05$)

2.5 อิทธิพลของกรดอินทรีย์

ผลการทดสอบกรดอินทรีย์ พบว่าเชื้อ *G. orbiforme* K4/2 ผลิตเอนไซม์แลคเคส และเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq 0.05$) เมื่อเติม acetic acid, citric acid (ความเข้มข้น 20, 40, 60 และ 80 mM) และ lactic acid (ความเข้มข้น 20, 40 และ 80 mM) โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสอยู่ระหว่าง 0.00 ถึง $15.36\pm 0.25 \times 10^{-3}$ ยูนิต/มิลลิลิตร และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสอยู่ระหว่าง 0.00 ถึง $6.16\pm 0.42 \times 10^{-3}$ ยูนิต/มิลลิลิตร และเชื้อ *G. orbiforme* K4/2 ผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq 0.05$) เมื่อเติม acetic acid (ความเข้มข้น 20, 40, 60 และ 80 mM), citric acid

(ความเข้มข้น 20, 60 และ 80 mM) และ lactic acid (ความเข้มข้น 20, 40 และ 80 mM) ซึ่งมีค่ากิจกรรมอยู่ระหว่าง 0.00 ถึง $9.71 \pm 0.32 \times 10^{-3}$ ยูนิต/มิลลิลิตร (ตารางที่ 4)

กรดอินทรีย์ คือ กรดที่ได้จากธรรมชาติ เป็นกรดที่มีฤทธิ์กัดกร่อนไม่รุนแรง หรือเป็นกรดอ่อน ซึ่งมีอะตอมคาร์บอนเป็นองค์ประกอบหลัก สามารถใช้ในการถนอมอาหารเพื่อปรับค่า pH ของอาหาร หรือใช้เป็นสารกันเสียป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ และจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนปนนท์, 2553; ศุภาวิตา จรรยา, 2563) การเติมกรดอินทรีย์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเนื้อไม้เนื่องจากกรดอินทรีย์สามารถเปลี่ยน pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ (Asif *et al.*, 2017) ซึ่งสอดคล้องกับผลจากการศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างที่ได้นำเสนอในงานวิจัยนี้ อีกทั้งกรดอินทรีย์บางชนิด เช่น EDTA, oxalic acid และ citric acid สามารถปิดกั้นการจับคอปเปอร์ (Cu) ของเอนไซม์แลคเคส และจากรายงานของ Phoka และคณะ (2020) ที่ได้ศึกษาสารต้านเชื้อราต่างๆ ที่เชื้อ *T. asperelloides* PSU-P1 สร้างขึ้นพบว่าสารประกอบ acetic acid สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Ganoderma* sp. ได้

ตารางที่ 4 ผลของกรดอินทรีย์ต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อรา *Ganoderma orbiforme* K4/2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง

Treatment	Concentration (mM)	Enzyme activity ($\times 10^{-3}$ U/ml) ^{1/}		
		Lac	MnP	LiP
Control	0	18.11 $\pm$ 0.21b	15.05 $\pm$ 0.31c	22.83 $\pm$ 0.82b
Acetic acid	20	3.86 $\pm$ 0.15g	4.70 $\pm$ 0.12f	0.00 $\pm$ 0.00f
	40	0.00 $\pm$ 0.00i	0.67 $\pm$ 0.25gh	0.00 $\pm$ 0.00f
	60	0.00 $\pm$ 0.00i	0.00 $\pm$ 0.00h	0.00 $\pm$ 0.00f
	80	0.07 $\pm$ 0.12i	0.00 $\pm$ 0.00h	0.00 $\pm$ 0.00f
Citric acid	20	8.06 $\pm$ 0.10d	7.59 $\pm$ 0.12e	0.00 $\pm$ 0.00f
	40	15.36 $\pm$ 0.25c	15.99 $\pm$ 0.21b	6.16 $\pm$ 0.42c
	60	6.45 $\pm$ 0.30e	9.34 $\pm$ 0.35d	5.25 $\pm$ 0.57d
	80	8.10 $\pm$ 0.15d	9.71 $\pm$ 0.32d	4.08 $\pm$ 0.27e
Lactic acid	20	5.65 $\pm$ 0.10f	5.21 $\pm$ 0.06f	0.00 $\pm$ 0.00f
	40	1.21 $\pm$ 0.20h	1.08 $\pm$ 0.21g	0.00 $\pm$ 0.00f
	60	40.66 $\pm$ 0.62a	35.82 $\pm$ 0.61a	46.74 $\pm$ 0.72a
	80	0.00 $\pm$ 0.00i	0.00 $\pm$ 0.00h	0.00 $\pm$ 0.00f

^{1/} ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในแนวดิ่งของตารางไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเปรียบเทียบโดย Tukey's HSD ($p>0.05$)

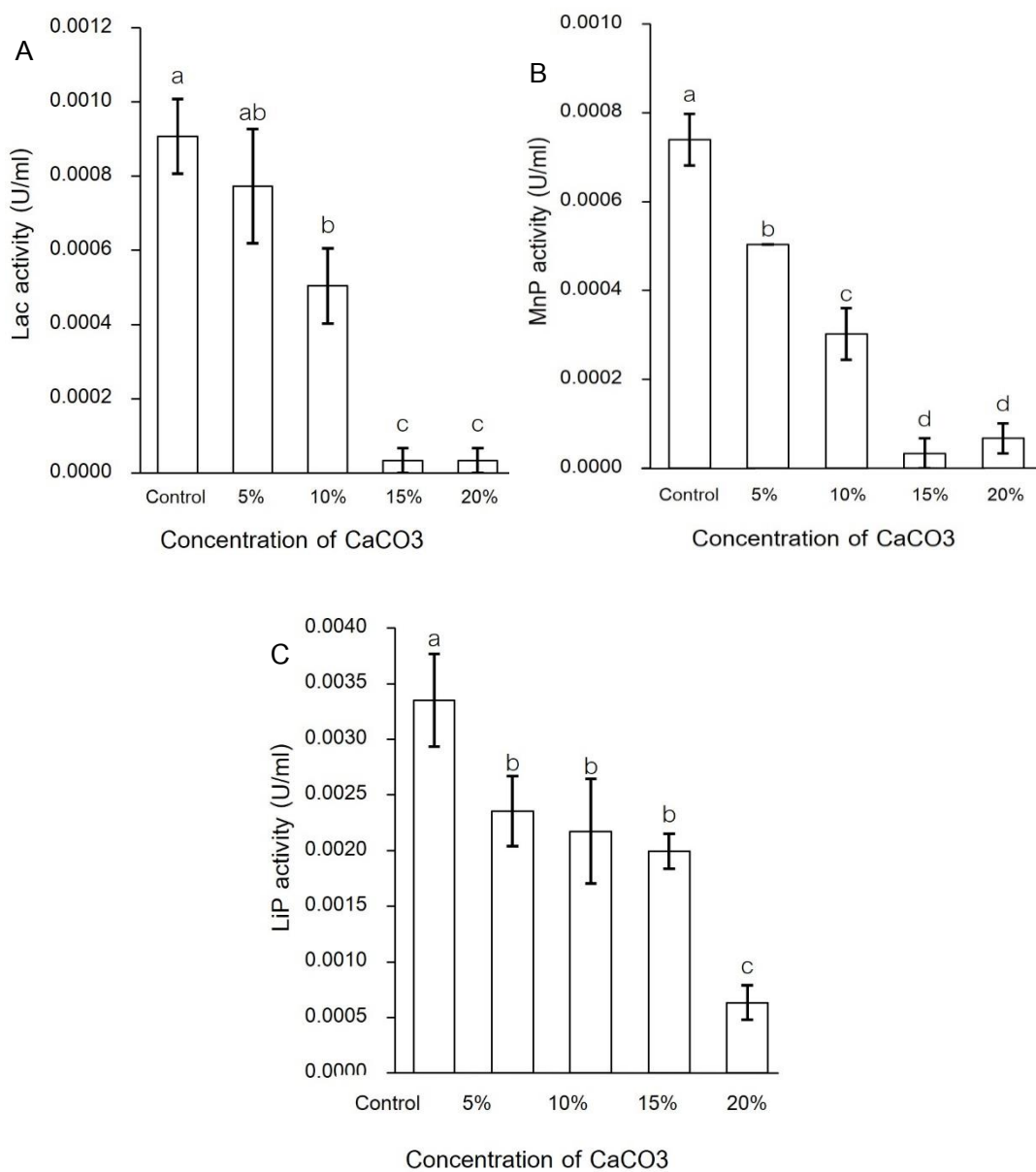
2.6 อิทธิพลของปูนขาว

จากการทดสอบผลของ CaCO_3 ต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน พบว่าที่ความเข้มข้น 10, 15 และ 20% ส่งผลให้เชื้อ *G. orbiforme* K4/2 ผลิตเอนไซม์แลคเคส และเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยเอนไซม์แลคเคสมีค่ากิจกรรมเท่ากับ 0.005, 0.00003 และ 0.00003 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 17A) และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 0.0003, 0.00003 และ 0.00007 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 17B) ส่วนเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสพบว่าการเติม CaCO_3 ทุกความเข้มข้นส่งผลให้มีค่ากิจกรรมลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ภาพที่ 17C) โดยจากการศึกษาค่า pH ที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์

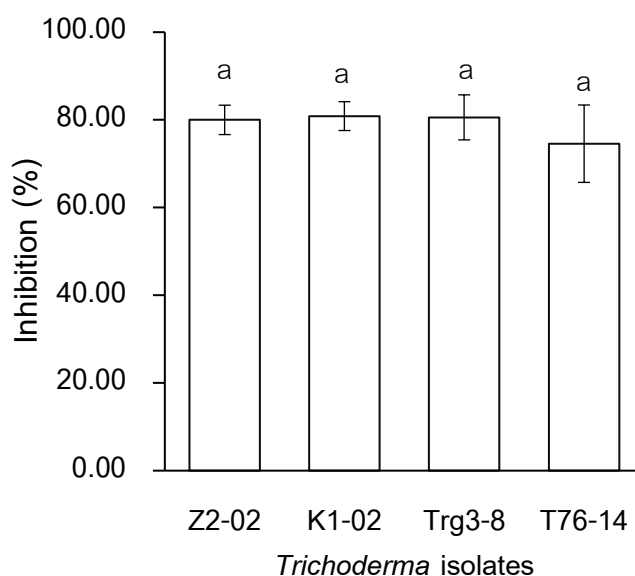
ย่อยสลายลิกนิน (ผลการทดลองข้อ 2.1) พบว่าเชื้อ *G. orbiforme* K4/2 ผลิตเอนไซม์ได้ลดลงเมื่อเลี้ยงเชื้อที่ pH สูง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Keiblinger และคณะ (2016) การเติม CaCO_3 ส่งผลให้วัสดุเลี้ยงเชื้อ หรือดินต่าง ๆ มีค่า pH เพิ่มขึ้น และจากรายงานของ Chen และคณะ (2020) การเติม CaCO_3 ส่งผลให้มีโครงสร้างจุลภาคของดินดีขึ้น ดังนั้นจากการศึกษาค้นคว้านี้หากต้องการปรับ pH ให้สูงขึ้นด้วย CaCO_3 ความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 10%

2.7 กลไกการแก่งแย่งแข่งขัน

จากการทดสอบกลไกการแก่งแย่งแข่งขันระหว่างเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. และเชื้อ *G. orbiforme* K4/2 ด้วยวิธี dual culture พบว่าเชื้อ *Trichoderma* ทุกไอโซเลต (*Trichoderma* sp. Z2-02, *T. asperellum* K1-02, *T. asperellum* T76-14 และ *Trichoderma* sp. Trg3-8) ที่ใช้ในการทดสอบในครั้งนี้มีความสามารถในการเจริญบนอาหาร PDA มากกว่าเชื้อ *G. orbiforme* K4/2 และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งโดยเฉลี่ยร้อยละ 80 โดยไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างไอโซเลตที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ภาพที่ 18) สอดคล้องกับรายงานของ Musa และคณะ (2017) ที่ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *G. boninense* ด้วย *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. virens* และ *T. brevicompactum* พบว่าเชื้อ *Trichoderma* ที่ทดสอบสามารถยับยั้งการเจริญของ *G. boninense* ได้ และมีรายงานว่า *T. asperellum* LF11 สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อ *G. boninense* ได้ (Sim et al., 2019) ซึ่งโดยทั่วไปเชื้อราปฏิปักษ์มีกลไกการแก่งแย่งแข่งขันเพื่อแก่งแย่งพื้นที่อาศัย และสารอาหารจากเชื้อสาเหตุโรคส่งผลให้เชื้อราปฏิปักษ์เจริญได้ดี และเจริญได้รวดเร็วกว่า (Howell, 2003)



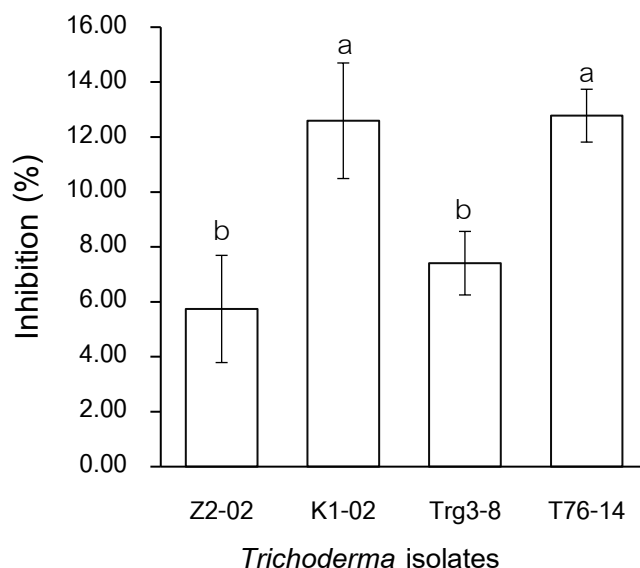
ภาพที่ 17 ความเข้มข้นของ CaCO₃ ที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อรา *Ganoderma orbiforme* K4/2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (กราฟแท่งคือค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ และตัวอักษรที่กำกับเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$))



ภาพที่ 18 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเชื้อ *Trichoderma* spp. ต่อเชื้อรา *Ganoderma orbiforme* K4/2 ด้วยวิธี dual culture (กราฟแท่งคือค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ และตัวอักษรที่กำกับเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$))

2.8 การสร้างสารระเหยของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิบัติ

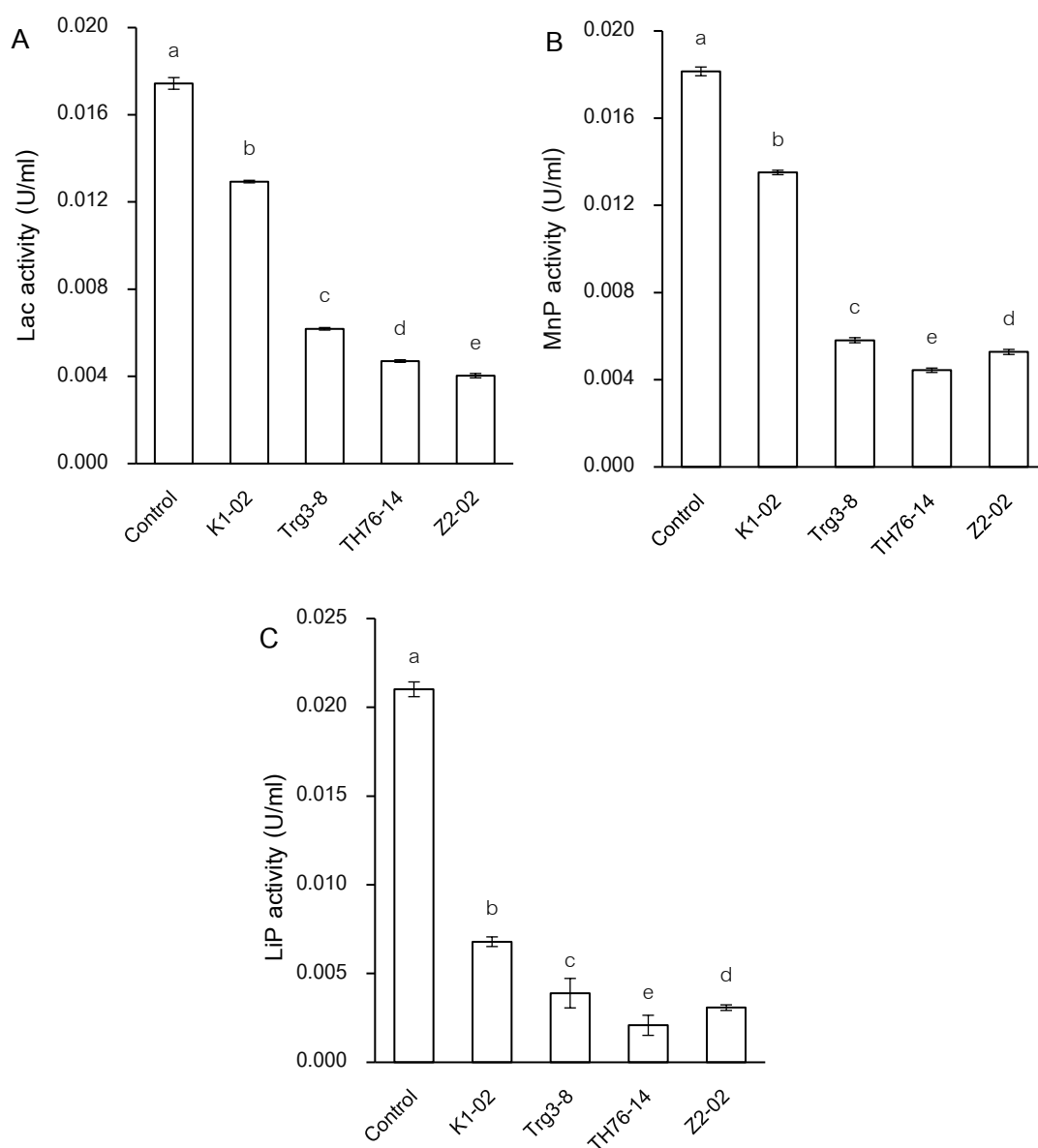
จากการทดสอบการสร้างสารระเหยของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิบัติที่มีผลต่อการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *G. orbiforme* K4/2 ด้วยวิธี sealed plate พบว่า *T. asperellum* K1-02 และ *T. asperellum* T76-14 สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *G. orbiforme* K4/2 ได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 12.59 และ 12.78 % ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างจาก *Trichoderma* sp. Z2-02 และ *Trichoderma* sp. Trg3-8 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ภาพที่ 19) จากการศึกษาของ Wonglom และคณะ (2019) ที่ศึกษาสารระเหยที่เชื้อ *Trichoderma* sp. T76-12/2 ผลิตขึ้น แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี GC/MS พบว่าสารที่เชื้อปลดปล่อยเป็นสารต้านเชื้อรา กลุ่มแอลกอฮอล์ (phenylethyl alcohol) และ sesquiterpene (epi-cubenol) และพบว่าเชื้อ *T. asperellum* T76-14 สามารถสร้างสารระเหยในกลุ่ม phenylethyl alcohol มายับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคได้ (Intana *et al.*, 2021)



ภาพที่ 19 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเชื้อ *Trichoderma* spp. ต่อเชื้อรา *Ganoderma orbiforme* K4/2 ด้วยวิธี sealed plate (กราฟแท่งคือค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ และตัวอักษรที่กำกับเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$))

2.9 ผลของน้ำคั้นเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ปฏิบัติต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำคั้นเลี้ยงเชื้อ *Trichoderma* spp. ที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา *G. orbiforme* K4/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งพบว่าเชื้อ *Trichoderma* ทุกไอโซเลต (*Trichoderma* sp. Z2-02, *T. asperellum* K1-02, *T. asperellum* T76-14 และ *Trichoderma* sp. Trg3-8) สามารถลดค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และลิกนินเปอร์ออกซิเดสได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ($p\leq 0.05$) (ภาพที่ 20) สอดคล้องกับการศึกษาของ Muniroh และคณะ (2019) ที่ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *P. aeruginosa* (UPM P3) และเชื้อ *T. asperellum* (UPM29) ด้วยวิธี dual culture และวิธี culture filtrate พบว่าเชื้อทั้ง 2 ชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *G. boninense* (UPM13) และสามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนส กลูคาเนส และเซลลูเลสได้ ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ถือเป็นกลไกการทำลายชีวิตที่เป็นคุณสมบัติที่สำคัญของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ จึงส่งผลให้การเจริญของเส้นใยของเชื้อ *G. boninense* ลดลงได้ (Musa et al., 2017)



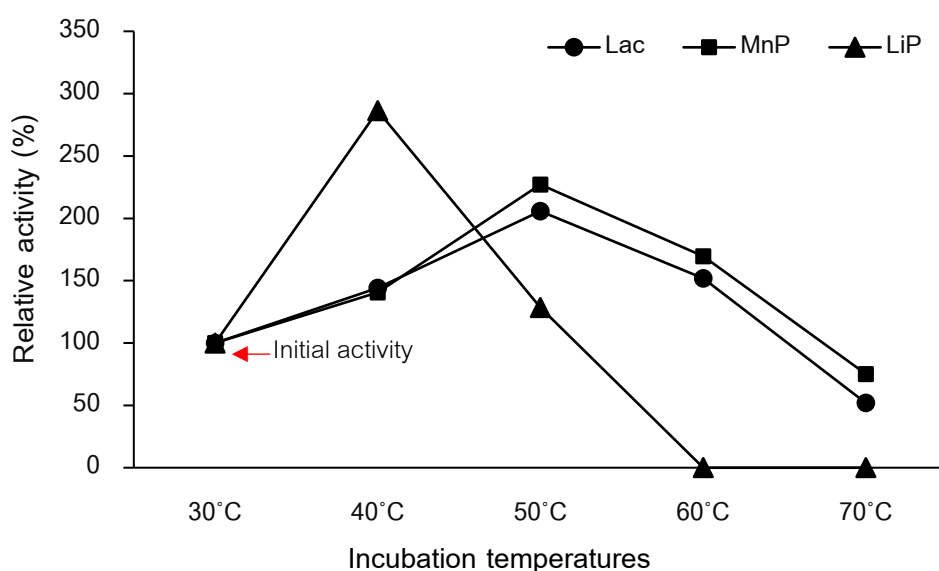
ภาพที่ 20 ผลของน้ำเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายของเชื้อรา *Ganoderma orbiforme* K4/2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (กราฟแท่งคือค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ และตัวอักษรที่กำกับเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$))

3. ปัจจัยทางกายภาพ และเคมีที่มีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์

3.1 ผลของอุณหภูมิ

ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่นำไปบ่ม ณ อุณหภูมิต่าง ๆ มีค่าเริ่มต้น (initial activity) เท่ากับ 0.0026 ยูนิต/มิลลิลิตร คิดเป็น 100% ซึ่งพบว่าการบ่มเอนไซม์สัปดาห์ที่อุณหภูมิ 70 °C นาน 1 ชั่วโมง ทำให้

เอนไซม์แลคเคส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสมีค่ากิจกรรมลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสลดลง 48.09% และค่ากิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสลดลง 24.81% ส่วนเอนไซม์ลิกันินเปอร์ออกซิเดสมีค่ากิจกรรมลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 1 ชั่วโมง (ภาพที่ 21) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Manavalan และคณะ (2015) ที่ศึกษาอุณหภูมิต่าง ๆ (20–65 °C) ต่อการทำงานของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสของเชื้อรา *G. lucidum* พบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 50 °C ส่งผลให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสลดลง และจากรายงานของ Surendran และคณะ (2018) พบว่าเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดดังกล่าวมีความคงที่ (stability) ของค่ากิจกรรมอยู่ในช่วง 40–60 °C และจะเสียสภาพได้ที่อุณหภูมิ 70 °C (Patel et al., 2014)



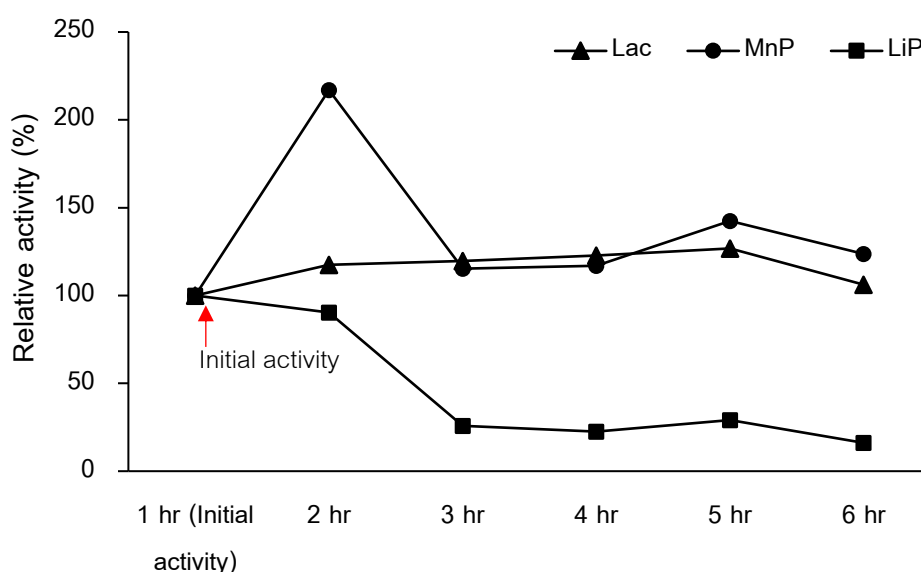
ภาพที่ 21 อุณหภูมิที่ส่งผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายลิกันินของเชื้อรา *Ganoderma orbiforme* K4/2

3.2 ผลของระยะเวลา

จากการทดสอบผลของอุณหภูมิ (ภาพที่ 21) เห็นได้ว่าเอนไซม์แลคเคส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสทนต่ออุณหภูมิสูงได้ที่ 50 °C และลิกันินเปอร์ออกซิเดสมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 40 °C จึงได้ทำการบ่มเอนไซม์สกัดหยาบ ณ อุณหภูมินั้น ๆ ต่อไป พบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคส และเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสไม่ลดลงแม้บ่มเป็นเวลาถึง 6 ชั่วโมง ส่วนเอนไซม์ลิกันินเปอร์ออกซิเดสมีค่ากิจกรรมลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อบ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง (ภาพที่ 22)

เชื้อราในกลุ่มราผู้สีขาวสามารถผลิตเอนไซม์ที่ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ โดยจากรายงานของ Jordaan and Leukes (2003) พบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสของเชื้อ *Trametes versicolor* ที่บ่มที่ 60

°C ลดลงครึ่งหนึ่งเมื่อบ่มเป็นเวลา 9 ชั่วโมง ดังนั้นเมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิสูงขึ้น และระยะเวลาบ่มที่มากขึ้นจะส่งผลให้ความคงที่ของค่ากิจกรรมเอนไซม์ลดลงเนื่องจากโครงสร้างของเอนไซม์ถูกทำลาย (Hu *et al.*, 2014; Ayuso-Fernandez *et al.*, 2018) ซึ่งค่าครึ่งชีวิต (half-life) ของแลคเคสที่อุณหภูมิ 50 °C มีค่าตั้งแต่วันที่จนถึงหลายสิบชั่วโมง (Baldrian, 2006) และจากรายงานของ Giap และคณะ (2022) พบว่าความสามารถในการคงอยู่ของกิจกรรมเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 40 °C ลดลงถึง 75% หลังจากบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

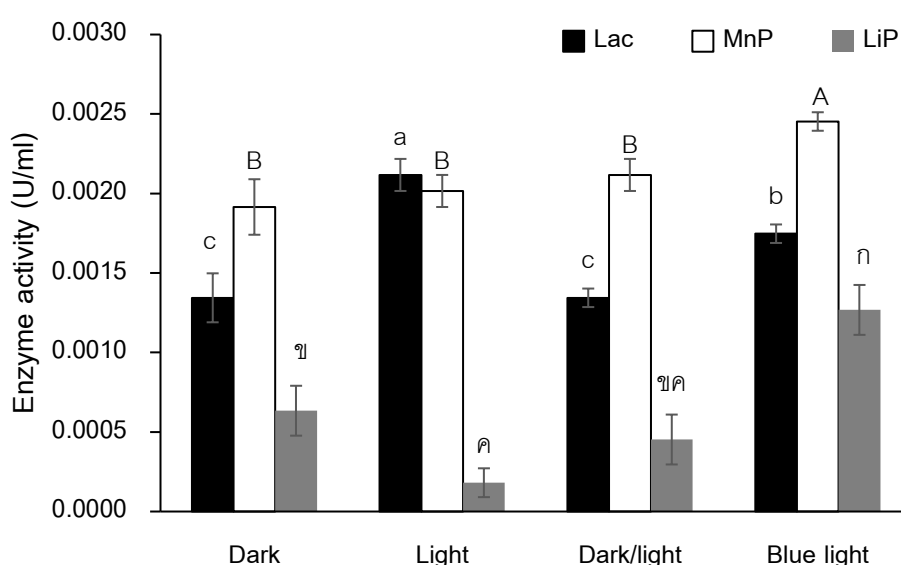


ภาพที่ 22 ระยะเวลาที่ส่งผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อ *Ganoderma orbiforme* K4/2

3.3 ผลของแสง

จากการทดสอบแสงต่อการทำงานของเอนไซม์ในระยะเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าการบ่มเอนไซม์สกัดหยาบในที่มืด ที่มีดสลับกับให้แสง LED และภายใต้แสงสีฟ้าส่งผลให้เอนไซม์แลคเคสมีค่ากิจกรรมเท่ากับ 0.0013, 0.0013 และ 0.0017 ยูนิต/มิลลิลิตร แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับการบ่มเอนไซม์สกัดหยาบภายใต้แสง LED (0.0021 ยูนิต/มิลลิลิตร) ส่วนการบ่มเอนไซม์สกัดหยาบในที่มืด ภายใต้แสง LED และที่มีดสลับกับให้แสง LED ส่งผลให้เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับการบ่มเอนไซม์สกัดหยาบภายใต้แสงสีฟ้า โดยเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสมีค่ากิจกรรมเท่ากับ 0.0019, 0.0020 และ 0.0021 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ และเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 0.0006, 0.0002 และ 0.0005 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 23)

ความแตกต่างของความยาวคลื่นแสงบางชนิดอาจกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มขึ้น หรือลดลงของค่ากิจกรรมเอนไซม์ได้ (Mayer, 2006) และจากรายงานของ Hernandez และคณะ (2016) พบว่าแลคเคสออกเซลลินใน *Pycnoporus sanguineus* จะตอบสนองต่อแสงโดยที่ความยาวคลื่นต่ำเอนไซม์แลคเคสจะถูกยับยั้ง และที่ความยาวคลื่นสูงสามารถยับยั้งเอนไซม์แลคเคสได้เพียงบางส่วน แต่ในการศึกษาในครั้งนี้มีปัจจัยของอุณหภูมิเข้ามารบกวน เนื่องจากผู้ทดลองวางหลอดเซนติฟิวส์ที่มีเอนไซม์ใกล้หลอดไฟเกินไป



ภาพที่ 23 แสงที่ส่งผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อ *Ganoderma orbiforme* K4/2 ตัวอักษรกำกับที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบเอนไซม์ชนิดเดียวกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3.4 ผลของธาตุอาหาร

ผลการทดสอบธาตุอาหารที่ส่งผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายของเชื้อ *G. orbiforme* K4/2 พบว่าธาตุอาหารที่ทดสอบเกือบทุกชนิดสามารถยับยั้งค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคส แมงกานีสเปอร์ออกไซด์ และลิกนินเปอร์ออกไซด์ได้ ยกเว้น K_2HPO_4 ที่ความเข้มข้น 1.25% (w/v) ที่ส่งผลให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส ($1.81 \pm 0.10 \times 10^{-3}$ ยูนิต/มิลลิลิตร) สูงกว่าชุดควบคุมที่มีค่ากิจกรรมเท่ากับ $1.75 \pm 0.06 \times 10^{-3}$ ยูนิต/มิลลิลิตร และการเติม $CuSO_4$ ที่ 0.03% (w/v) ส่งผลให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกไซด์ ($1.71 \pm 0.10 \times 10^{-3}$ ยูนิต/มิลลิลิตร) มีค่ามากกว่าชุดควบคุม ($1.68 \pm 0.12 \times 10^{-3}$ ยูนิต/มิลลิลิตร) นอกจากนี้ยังพบว่าการเติม $(NH_4)_2S_2O_8$

ทั้ง 3 ความเข้มข้นส่งผลให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (5.62 ± 0.31 , 20.74 ± 1.03 และ $20.11 \pm 0.72 \times 10^{-3}$ ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ) มีค่ามากกว่าชุดควบคุม ($1.90 \pm 0.27 \times 10^{-3}$ ยูนิต/มิลลิลิตร) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 5) จากรายงานของ Rosconi และคณะ (2005) พบว่า Fe, Mn และ Cu สามารถยับยั้งเอนไซม์แลคเคสที่เชื้อ *Sinorhizobium meliloti* ผลิตขึ้นโดยไฮดรอนของธาตุดังกล่าวรบกวนการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และมีรายงานว่า $ZnCl_2$, NaCl และ $CaCl_2$ สามารถยับยั้งเอนไซม์แลคเคสโดยการจับบริเวณ copper site ทำให้ไม่สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสได้ (Paterson *et al.*, 2008) และจากการค้นคว้าเพิ่มเติมพบว่าโลหะ (metal) มีความเป็นพิษต่อไฟลัม Basidiomycota (Sanglimsuwan *et al.*, 1993; Baldrian and Gabriel, 1997) ซึ่งจากรายงานของ Couto และคณะ (2005) ความคงที่ (stability) ของแลคเคสถูกยับยั้งได้ด้วยไฮดรอนของโลหะ เช่น Ca^{2+} , Zn^{2+} , K^+ , Cu^{2+} , Fe^{2+} และ Mn^{2+}

ตารางที่ 5 ผลของธาตุอาหารต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อ *Ganoderma orbiforme* K4/2

Treatment	Concentration (%)	Enzyme activity ($\times 10^{-3}$ U/ml) ^{1/}		
		Lac	MnP	LiP
Control	-	1.75 $\pm$ 0.06a	1.68 $\pm$ 0.12abc	1.90 $\pm$ 0.27c
CaCl ₂	0.2	0.44 $\pm$ 0.06ijk	0.94 $\pm$ 0.06fgh	0.00 $\pm$ 0.00e
	0.6	0.60 $\pm$ 0.00fghij	0.84 $\pm$ 0.06ghi	0.00 $\pm$ 0.00e
	1.0	0.47 $\pm$ 0.06hijk	0.03 $\pm$ 0.06l	0.00 $\pm$ 0.00e
CuSO ₄	0.03	1.34 $\pm$ 0.12bcd	1.71 $\pm$ 0.10ab	0.00 $\pm$ 0.00e
	0.09	1.31 $\pm$ 0.17bcd	0.64 $\pm$ 0.23hij	0.72 $\pm$ 0.31de
	0.15	1.51 $\pm$ 0.10abc	0.00 $\pm$ 0.00l	0.00 $\pm$ 0.00e
FeSO ₄	0.002	0.67 $\pm$ 0.06fghi	1.78 $\pm$ 0.12a	0.00 $\pm$ 0.00e
	0.0035	1.55 $\pm$ 0.12ab	1.28 $\pm$ 0.15de	0.18 $\pm$ 0.16e
	0.005	0.57 $\pm$ 0.06ghijk	0.47 $\pm$ 0.06j	0.00 $\pm$ 0.00e
H ₃ BO ₃	0.08	0.91 $\pm$ 0.10ef	1.44 $\pm$ 0.06bcd	0.00 $\pm$ 0.00e
	0.24	1.55 $\pm$ 0.06ab	0.74 $\pm$ 0.12ghij	0.18 $\pm$ 0.31e
	0.40	0.77 $\pm$ 0.15fgh	0.50 $\pm$ 0.10j	0.00 $\pm$ 0.00e
H ₃ PO ₄	0.1	0.30 $\pm$ 0.00jklm	0.13 $\pm$ 0.06kl	0.09 $\pm$ 0.16e
	0.2	0.60 $\pm$ 0.17fghij	0.60 $\pm$ 0.10ij	0.00 $\pm$ 0.00e
	0.3	0.34 $\pm$ 0.15jkl	0.07 $\pm$ 0.06l	0.00 $\pm$ 0.00e
K ₂ HPO ₄	0.7	0.84 $\pm$ 0.12fg	1.51 $\pm$ 0.00abcd	0.09 $\pm$ 0.16e
	1.25	1.81 $\pm$ 0.10a	1.38 $\pm$ 0.06cd	0.09 $\pm$ 0.16e
	1.8	0.54 $\pm$ 0.06ghijk	0.67 $\pm$ 0.12hij	0.00 $\pm$ 0.00e
MgSO ₄	0.2	0.84 $\pm$ 0.06fg	0.91 $\pm$ 0.10ghi	0.00 $\pm$ 0.00e
	0.45	1.21 $\pm$ 0.10cde	1.01 $\pm$ 0.17efg	0.54 $\pm$ 0.27de
	0.7	0.57 $\pm$ 0.15ghijk	0.44 $\pm$ 0.12jk	0.00 $\pm$ 0.00e

ตารางที่ 5 ผลของธาตุอาหารต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อ *Ganoderma orbiforme* K4/2 (ต่อ)

Treatment	Concentration (%)	Relative activity ($\times 10^{-3}$ U/ml) ^{1/}		
		Lac	MnP	LiP
MnSO ₄	0.0025	0.60 $\pm$ 0.00fghij	1.81 $\pm$ 0.10a	0.00 $\pm$ 0.00e
	0.02125	1.61 $\pm$ 0.10ab	1.24 $\pm$ 0.06def	1.18 $\pm$ 0.16cd
	0.04	1.18 $\pm$ 0.12de	0.60 $\pm$ 0.17ij	0.00 $\pm$ 0.00e
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	2.0	0.00 $\pm$ 0.00m	0.03 $\pm$ 0.06l	5.62 $\pm$ 0.31b
	2.5	0.07 $\pm$ 0.06lm	0.03 $\pm$ 0.06l	20.74 $\pm$ 1.03a
	3.0	0.00 $\pm$ 0.00m	0.00 $\pm$ 0.00l	20.11 $\pm$ 0.72a
ZnSO ₄	0.1	0.27 $\pm$ 0.06klm	1.41 $\pm$ 0.10bcd	0.00 $\pm$ 0.00e
	0.45	0.50 $\pm$ 0.10hijk	0.64 $\pm$ 0.06hij	0.36 $\pm$ 0.31de
	0.8	0.54 $\pm$ 0.06ghijk	0.03 $\pm$ 0.06l	0.00 $\pm$ 0.00e

^{1/} ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในแนวตั้งของตารางไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเปรียบเทียบโดย Tukey's HSD ($p>0.05$)

3.5 ผลของสารประกอบฟีนอลิก

การทดลองในครั้งนี้พบว่าสารประกอบฟีนอลิกที่ส่งผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายของเชื้อรา *G. orbiforme* K4/2 ได้แก่ azure B, guaiacol, phenol และ salicylic acid ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 30 mM สามารถลดค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส (มีค่ากิจกรรมอยู่ระหว่าง 0.00 ถึง $2.49\pm 0.15 \times 10^{-3}$ ยูนิต/มิลลิลิตร) และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสเคส (มีค่ากิจกรรมอยู่ระหว่าง 0.00 ถึง $2.65\pm 0.12 \times 10^{-3}$ ยูนิต/มิลลิลิตร) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคส $5.38\pm 0.21 \times 10^{-3}$ ยูนิต/มิลลิลิตร และเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส $5.98\pm 0.15 \times 10^{-3}$ ยูนิต/มิลลิลิตร นอกจากนี้ azure B ความเข้มข้น 10 mM และ salicylic acid และ guaiacol ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 30 mM ส่งผลต่อเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสโดยทำให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 0.00 ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ $4.08\pm 0.27 \times 10^{-3}$ ยูนิต/มิลลิลิตร แต่ทั้งนี้การเติม azure B ที่ 20 และ 30 mM และ phenol ความเข้มข้น 10, 20 และ 30 mM กลับทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุด

ควบคุม (ตารางที่ 6) เชื้อราในกลุ่มราผู้สีขาว สามารถสร้างเอนไซม์แลคเคส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และลิกนินเปอร์ออกซิเดสเพื่อย่อยสลายสีย้อมสังเคราะห์ประเภทสารประกอบฟีนอลิก และอะโรมาติกได้ (Ollikka *et al.*, 1993; Sivasakthivelan, 2013) แต่พบว่า salicylic acid และ guaiacol ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นไปสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และลิกนินเปอร์ออกซิเดสได้ โดยการยับยั้งบริเวณเร่งปฏิกิริยา หรือ active site (Surendran *et al.*, 2018)

ตารางที่ 6 ผลของสารประกอบฟีนอลิกต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อ *Ganoderma orbiforme* K4/2

Treatment	Concentration (mM)	Enzyme activity ($\times 10^{-3}$ U/ml) ^{1/}		
		Lac	MnP	LiP
Control	0	5.38 $\pm$ 0.21a	5.98 $\pm$ 0.15a	4.08 $\pm$ 0.27d
Azure B	10	0.24 $\pm$ 0.15ef	0.00 $\pm$ 0.00d	0.00 $\pm$ 0.00e
	20	0.00 $\pm$ 0.00f	0.00 $\pm$ 0.00d	33.61 $\pm$ 1.13b
	30	0.00 $\pm$ 0.00f	0.00 $\pm$ 0.00d	35.51 $\pm$ 0.57a
Guaiacol	10	0.91 $\pm$ 0.27c	0.60 $\pm$ 0.20c	0.00 $\pm$ 0.00e
	20	0.50 $\pm$ 0.17cde	0.00 $\pm$ 0.00d	0.00 $\pm$ 0.00e
	30	0.40 $\pm$ 0.00def	0.00 $\pm$ 0.00d	0.00 $\pm$ 0.00e
Phenol	10	2.08 $\pm$ 0.15b	2.32 $\pm$ 0.27b	5.62 $\pm$ 0.42c
	20	2.42 $\pm$ 0.10b	2.62 $\pm$ 0.10b	6.52 $\pm$ 0.27c
	30	2.49 $\pm$ 0.15b	2.65 $\pm$ 0.12b	6.70 $\pm$ 0.42c
Salicylic acid	10	0.81 $\pm$ 0.17cd	0.74 $\pm$ 0.12c	0.00 $\pm$ 0.00e
	20	0.71 $\pm$ 0.10cd	0.71 $\pm$ 0.10c	0.00 $\pm$ 0.00e
	30	0.27 $\pm$ 0.12ef	0.57 $\pm$ 0.06c	0.00 $\pm$ 0.00e

^{1/} ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในแนวตั้งของตารางไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเปรียบเทียบโดย Tukey's HSD ($p>0.05$)

3.6 ผลของกรดอินทรีย์

จากการทดสอบกรดอินทรีย์พบว่า acetic acid, citric acid และ lactic acid ที่ความเข้มข้น 20, 40, 60 และ 80 mM ส่งผลให้เอนไซม์แลคเคสมีค่ากิจกรรมอยู่ระหว่าง 0.00 ถึง $4.70 \pm 0.31 \times 10^{-3}$ ยูนิต/มิลลิลิตร แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสมีค่ากิจกรรมอยู่ระหว่าง 0.00 ถึง $4.84 \pm 0.27 \times 10^{-3}$ ยูนิต/มิลลิลิตร และลิกนินเปอร์ออกซิเดสมีค่ากิจกรรมอยู่ระหว่าง 0.00 ถึง $1.72 \pm 0.16 \times 10^{-3}$ ยูนิต/มิลลิลิตร โดยค่ากิจกรรมเอนไซม์ดังกล่าวลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสเท่ากับ $11.12 \pm 0.45 \times 10^{-3}$ ยูนิต/มิลลิลิตร แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ $17.20 \pm 0.21 \times 10^{-3}$ ยูนิต/มิลลิลิตร และลิกนินเปอร์ออกซิเดสมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ $9.69 \pm 0.42 \times 10^{-3}$ ยูนิต/มิลลิลิตร (ตารางที่ 7) Kishore และคณะ (2012) พบว่าสารละลายกรดอินทรีย์ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจะย่อยสลายองค์ประกอบของโครงสร้างโปรตีนทำให้เอนไซม์เสียสภาพ และจากการศึกษาของ Hassan และคณะ (2015) พบว่าสารอินทรีย์ 8 ชนิดได้แก่ propionic, acetic, formic, lactic, tartaric, citric, oxalic และ malic acid มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *Aspergillus flavus*, *Penicillium purpurogenum*, *Rhizopus nigricans* และ *Fusarium oxysporum* และสามารถลด aflatoxin B1 ที่เชื้อราผลิตขึ้นมาได้

ตารางที่ 7 ผลของกรดอินทรีย์ต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อ *Ganoderma orbiforme* K4/2

Treatment	Concentration (mM)	Enzyme activity ($\times 10^{-3}$ U/ml) ^{1/}		
		Lac	MnP	LiP
Control	0	11.12 $\pm$ 0.45a	17.20 $\pm$ 0.21a	9.69 $\pm$ 0.42a
Acetic acid	20	3.93 $\pm$ 0.30c	4.84 $\pm$ 0.27b	0.00 $\pm$ 0.00c
	40	3.97 $\pm$ 0.21c	3.86 $\pm$ 0.15c	1.72 $\pm$ 0.16b
	60	4.70 $\pm$ 0.31b	3.83 $\pm$ 0.17c	0.00 $\pm$ 0.00c
	80	4.57 $\pm$ 0.25bc	3.66 $\pm$ 0.32c	0.00 $\pm$ 0.00c
Citric acid	20	0.30 $\pm$ 0.10ef	0.27 $\pm$ 0.06g	0.00 $\pm$ 0.00c
	40	0.10 $\pm$ 0.17f	0.30 $\pm$ 0.17g	0.00 $\pm$ 0.00c
	60	0.00 $\pm$ 0.00f	0.00 $\pm$ 0.00g	0.00 $\pm$ 0.00c
	80	0.00 $\pm$ 0.00f	0.00 $\pm$ 0.00g	0.00 $\pm$ 0.00c
Lactic acid	20	0.94 $\pm$ 0.15de	0.87 $\pm$ 0.15ef	0.00 $\pm$ 0.00c
	40	0.94 $\pm$ 0.23de	1.28 $\pm$ 0.21de	0.00 $\pm$ 0.00c
	60	1.14 $\pm$ 0.21d	1.41 $\pm$ 0.17d	0.00 $\pm$ 0.00c
	80	0.97 $\pm$ 0.21de	0.50 $\pm$ 0.10fg	0.00 $\pm$ 0.00c

^{1/} ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในแนวดังของตารางไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเปรียบเทียบโดย Tukey's HSD ($p>0.05$)

จากการศึกษาในครั้งนี้ สามารถสรุปปัจจัยทางกายภาพ เคมี และชีวภาพที่ส่งผลต่อการยับยั้งการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน และค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อรา *G. orbiforme* K4/2 ได้ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ผลของปัจจัยทางกายภาพ เคมี และชีวภาพต่อเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน

Factors	Inhibition effect	
	Enzyme production	Enzyme activity
ปัจจัยทางกายภาพ		
- pH 8.0	✓	
- บ่มในที่มืด	✓	✓
- บ่มในที่มืดสลับแสง LED	✓	✓
- บ่มภายใต้แสงสีฟ้า	✓	
- อุณหภูมิ 30–40°C	✓	
- อุณหภูมิในการบ่มเอนไซม์ 70°C		✓
ปัจจัยทางเคมี		
- ธาตุอาหาร		
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ ความเข้มข้น 2.0–3.0%	✓	
H ₃ PO ₄ ความเข้มข้น 0.1–0.3%	✓	✓
K ₂ HPO ₄ ความเข้มข้น 1.8%		✓
MgSO ₄ ความเข้มข้น 0.2–0.7%	✓	✓
CaCl ₂ ความเข้มข้น 0.2–1.0%	✓	✓
H ₃ BO ₃ ความเข้มข้น 0.08–0.24%	✓	
H ₃ BO ₃ ความเข้มข้น 0.40%	✓	✓
CuSO ₄ ความเข้มข้น 0.03–0.15%	✓	
ZnSO ₄ ความเข้มข้น 0.1%	✓	
ZnSO ₄ ความเข้มข้น 0.8%		✓

ตารางที่ 8 ผลของปัจจัยทางกายภาพ เคมี และชีวภาพต่อเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน (ต่อ)

Factors	Inhibition effect	
	Enzyme production	Enzyme activity
FeSO ₄ ความเข้มข้น 0.002–0.0035%	✓	
FeSO ₄ ความเข้มข้น 0.005%	✓	✓
MnSO ₄ ความเข้มข้น 0.0025–0.02125%	✓	
MnSO ₄ ความเข้มข้น 0.04%	✓	✓
- สารประกอบฟีนอลิก		
Azure B ความเข้มข้น 10 mM	✓	✓
Azure B ความเข้มข้น 20–30 mM	✓	
Guaiacol ความเข้มข้น 10–30 mM	✓	✓
Phenol ความเข้มข้น 10–30 mM	✓	
Salicylic acid ความเข้มข้น 10 mM		✓
Salicylic acid ความเข้มข้น 20–30 mM	✓	✓
- กรดอินทรีย์		
Acetic acid ความเข้มข้น 20–80 mM	✓	✓
Citric acid ความเข้มข้น 20, 60–80 mM	✓	✓
Lactic acid ความเข้มข้น 20–40 และ 80 mM	✓	✓
Lactic acid ความเข้มข้น 60 mM		✓
CaCO ₃ ความเข้มข้น 10–20%	✓	
ปัจจัยทางชีวภาพ		
- <i>Trichoderma</i> spp.	✓	

✓ = ยับยั้งการผลิตเอนไซม์ และค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของเชื้อ *G. orbiforme* K4/2

จากตารางที่ 8 สามารถนำข้อมูลดังกล่าวไปประยุกต์ใช้เพื่อควบคุมโรคลำต้นเน่าในปาล์ม น้ำมันได้เช่น ก่อนปลูกต้นกล้าควรปรับอุณหภูมิของดินให้อยู่ในช่วง 30–40°C ด้วยวิธี solarization (Stapleton *et al.*, 2019) แล้วปรับ pH ดินให้มี pH ประมาณ 8.0 ด้วยการเติมปูนขาว (Manan and Aziz,

2018) แล้วสามารถใช้เชื้อ *Trichoderma* sp. ร่วมกับวัสดุปลูก หรืออินทรีวัตถุเพื่อชักนำให้ปาล์มน้ำมัน เกิดความต้านทาน และนอกจากการใส่ปุ๋ยตามอาการที่ขาดธาตุอาหาร ใส่ปุ๋ยตามปริมาณที่ใช้ในการ เจริญเติบโต และใส่ปุ๋ยตามความต้องการของต้นปาล์มแล้ว การเติมธาตุอาหารเช่น CaCl_2 , CuSO_4 , FeSO_4 , H_3BO_3 , H_3PO_4 , MgSO_4 , MnSO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ และ ZnSO_4 สารประกอบฟีนอลิก และกรด อินทรีย์ยังส่งผลให้เชื้อ *G. orbiforme* K4/2 ผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกลินินลดลงได้เช่นเดียวกัน แต่ทั้งนี้งานวิจัยในอนาคตจะต้องมีการทดสอบการจัดการปัจจัยต่าง ๆ ดังกล่าวในระดับเรือนทดลอง หรือ แปลงเกษตรกรต่อไป

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การจัดการปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ pH การให้แสง และอุณหภูมิ ปัจจัยทางเคมี ได้แก่ ธาตุอาหาร สารประกอบฟีนอลิก กรดอินทรีย์ และการเติม CaCO_3 ให้เหมาะสม รวมทั้งการใช้ *Trichoderma* spp. (ปัจจัยทางชีวภาพ) สามารถยับยั้งการผลิต และการทำงานของเอนไซม์ แลคเคส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโดยเชื้อรา *G. orbiforme* K4/2 ก่อนเข้าทำลายต้นปาล์มน้ำมันได้ จากข้อมูลของปัจจัยต่าง ๆ ที่ได้จึงสามารถนำไปจัดทำเป็นคู่มือ เพื่อประยุกต์ใช้สำหรับควบคุมโรคลำต้นเน่าในปาล์มน้ำมันในอนาคตต่อไป

บรรณานุกรม

- ธีระ เอกสมทราเมษฐ์, ชัยรัตน์ นิลนนท์, ธีระพงศ์ จันทรนิยม, ประกิจ ทองคำ และ สมเกียรติ สีสนอง. 2548. เส้นทางสู่ความสำเร็จ: การผลิตปาล์มน้ำมัน. ศูนย์วิจัยและพัฒนาการผลิตปาล์มน้ำมัน. คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, หาดใหญ่ สงขลา.
- ชัยวัฒน์ ไชวเจริญสุข. 2566. อุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม. กรุงเทพฯ. (ออนไลน์) สืบค้นจาก <https://www.krungsri.com/th/research/industry/industry-outlook/agriculture/palm-oil/io/plam-oil-industry-2024-2026>. (26 มีนาคม 2567)
- บุญล้อม ชีวะอิสระกุล. 2546. ชีวเคมีทางสัตวศาสตร์. หจก. ธนบรรณการพิมพ์, เชียงใหม่.
- พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนูปนนท์. 2553. Organic acid. Food Network Solution. (ออนไลน์) สืบค้นจาก <https://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1538/organic-acid>. (25 ธันวาคม 2566)
- พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนูปนนท์. 2558. Cellulose. Food Network Solution. (ออนไลน์) สืบค้นจาก <https://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0612/cellulose>. (27 November 2563)
- วาริน อินทนา และ อรรถกร พรมวี. 2559. ประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิบั้กษาในการยับยั้งการเจริญของเติบโตของเชื้อรา *Ganoderma* sp. สาเหตุของโรคโคนรากเน่าของปาล์มน้ำมัน. หน่วยวิจัยไม้ผลเขตร้อน สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์, นครศรีธรรมราช.
- ศุภาวิตา จรรยา. 2563. สารประกอบอินทรีย์. (ออนไลน์) สืบค้นจาก <https://www.scimath.org/lesson-chemistry/item>. (27 ธันวาคม 566)
- สมพร ณ นคร และคณะ. 2560. คู่มือการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตปาล์มน้ำมัน.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2559. ปาล์มน้ำมัน (ออนไลน์) สืบค้นจาก <https://www.oae.go.th/view/ปาล์มน้ำมัน/TH-TH>. (26 พฤศจิกายน 2563)
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2565. ตารางรายละเอียดปาล์มน้ำมัน. (ออนไลน์) สืบค้นจาก <https://www.oae.go.th/view/ตารางแสดงรายละเอียดปาล์มน้ำมัน/TH-TH>. (26 มีนาคม 2567)
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2565. ตารางรายละเอียดปาล์มน้ำมัน. (ออนไลน์) สืบค้นจาก <https://wp-content/uploads/2022/02/Product-Profile-น้ำมันปาล์ม.pdf> (26 มีนาคม 2565)

- Abdul Khalil, H. P. S., Alwani, M. S., Ridzuan, R., Kamarudin, H. and Khairul, A. 2008. Chemical composition, morphological characteristics, and cell wall structure of Malaysian oil palm fibers. *Polymer-Plastic Technology and Engineering* 47: 273–280.
- Abubakar, A., Ishak, M. Y., Bakar, A. A., and Uddin, M. K. 2022. *Ganoderma boninense* basal stem rot induced by climate change and its effect on oil palm. *Environmental Sustainability* 5: 289–303.
- Adela, N. B., Nasrin, A. B., Loh, S. K. and Choo, Y. M. 2014. Bioethanol production by fermentation of oil palm empty fruit bunches pretreated with combined chemicals. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences* 4: 234–242.
- Alam, M. Z., Mansor, M. F. and Jalal, K. 2009b. Optimization of lignin peroxidase production and stability by *Phanerochaete chrysosporium* using sewage-treatment-plant sludge as substrate in a stirred-tank bioreactor. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36: 757–764.
- Amorim, G. M., Oliveira, A. C., Gutarra, M. L. E., Godoy, M. G. and Freire, D. M. G. 2017. Solid-state fermentation as a tool for methylxanthine reduction and simultaneous xylanase production in cocoa meal. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 11: 34–41.
- Amriani, F., Salim, F. A., Iskandinata, I., Khumsupan, D. and Barta, Z. 2016. Physical and biophysical pretreatment of water hyacinth biomass for cellulase enzyme production. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 30: 237–244.
- Angel, L. P. L., Yusof, M. T., Ismail, I. S., Ping, B. T. Y., Azni, I. N. A. M., Kamarudin, N. H. and Sundram, S. 2016. An in vitro study of the antifungal activity of *Trichoderma virens* 7b and a profile of its non-polar antifungal components released against *Ganoderma boninense*. *Journal of Microbiology* 54: 732–744.
- Asgher, M., Ramzan, M. and Bilal, M. 2016. Purification and characterization of manganese peroxidases from native and mutant *Trametes versicolor* IBL-04 . *Chinese Journal of Catalysis* 37: 561–570.

- Asif, M. B., Hai, F. I., Hou, J., Price, W. E. and Nghiem, L. D. 2017. Impact of wastewater derived dissolved interfering compounds on growth, enzymatic activity and trace organic contaminant removal of white rot fungi - A critical review. *Journal of Environmental Management* 201: 89–109.
- Atefeh, R., Campbell, C. D., Dahlin, S., Hillier, S. and Oborn, I. 2010. Relation of soil mineralogy and microbial communities based on micronutrient status. 19th World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World 27: 1–6.
- Ayuso-Fernandez, I., Ruiz-Duenas, F. J. and Martinez, A. T. 2018. Evolutionary convergence in lignin-degrading enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 115: 6428–6433.
- Baldrian, P. and Gabriel, J. 1997. Effect of heavy metals on the growth of selected wood-rotting Basidiomycetes. *Folia Microbiologica* 42: 521–523.
- Baldrian, P. 2006. Fungal laccase-occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews* 30: 215–242.
- Bastos, R. G., Motta, F. L. and Santana, M. H. A. 2016. Oxygen transfer in solid-state cultivation of *Drechslera monoceras* on polyurethane foam as an inert support. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 33: 1678–4383.
- Benitez, T., Rincon, A. M., Limon, M. C. and Codon, A. C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7: 249–260.
- Bivi, M. S. H. R., Paiko, A. S., Khairulmazmi, A., Akhtar, M. S. and Idris, A. S. 2016. Control of basal stem rot disease in oil palm by supplementation of calcium, copper and salicylic acid. *The Plant Pathology Journal* 32: 396–406.
- Bugg, T. D. H., Ahmad, M., Hardiman, E. M. and Rahmanpour, R. 2011. Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. *Natural Product Report* 28: 1883–1896.
- Canas, A. I. and Camarero, S. 2010. Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco- friendly processes. *Biotechnology Advances* 28: 694–705.

- Chen, L. J., Chen, X. J., Yang, X., Bi, P. Y., Ding, X., Huang, X. and Wang, H. 2020. Effect of calcium carbonate on the mechanical properties and microstructure of red clay. *Advances in Materials Science and Engineering* 6: 1–8.
- Chong, K. P., Rossall, S. and Atong, M. 2009. In vitro antimicrobial activity and fungitoxicity of syringic acid, caffeic acid and 4-hydroxybenzoic acid against *Ganoderma boninense*. *Journal of Agricultural Science* 1: 15–21.
- Christopher, L. P., Yao, B. and Ji, Y. 2014. Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. *Frontiers in Energy Research* 2: 1–12.
- Couto, S. R., Sanroman, M. and Gubitz, G. M. 2005. Influence of redox mediators and metal ions on synthetic acid dye decolourization by crude laccase from *Trametes hirsute*. *Chemosphere* 58: 417–422.
- Dennis, C. and Webster, J. 1971. Antagonist properties of species group of *Trichoderma*. III hypal interaction. *Transactions of the British Mycological Society* 57: 363–369.
- Devi, V. C., Mothil, S., Raam, R. S. and Senthilkumar, K. 2020. Thermochemical conversion and valorization of woody lignocellulosic biomass in hydrothermal media. In *Biomass Valorization to Bioenergy*: 45-63.
- Dias, A. A., Freitas, G. S., Marques, G. S. M., Sampaio, A., Fraga, I. S., Rodrigues, M. A. M., Evtuguin, D. V. and Bezerra, R. M. F. 2010. Enzymatic saccharification of biologically pre-treated wheat straw with white-rot fungi. *Bioresource Technology* 101: 6045–6050.
- Fairhurst, T. H. and Mutert, E. 1999. Interpretation and management of oil palm leaf analysis data. *Batter Crop International* 13: 48–51.
- Flood, J., Hasan, Y. and Foster, H. L. 2003. *Ganoderma* disease of oil palm-an interpretation from Bala Lias Research Station. *The Planter* 78: 689–710.
- Fravel, D. R., Olivain, C. and Alabouvette, C. 2003. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytologist* 157: 493–502.
- Giap, V., Nghi, D. H., Cuong, L. H. and Quynh, D. T. 2022. Lignin peroxidase from the white-rot fungus *Lentinus squarrosulus* MPN12 and its application in the biodegradation of synthetic dyes and lignin. *BioResources* 17: 4480–4498.

- Goh, K. M., Dickinson, M., Alderson, P., Yap, L. V. and Supramaniam, C. V. 2016. Development of an in-planta infection system for the early detection of *Ganoderma* spp. in oil palm. *Journal of Plant Pathology* 98: 255–264.
- Hariharan, S. and Nambisan, P. 2013. Optimization of lignin peroxidase, manganese peroxidase and lac production from *Ganoderma lucidum* under solid state fermentation of pineapple leaf. *BioResources* 8: 250–271.
- Hassan, R., El-Kadi, S. and Sand, M. 2015. Effect of some organic acids on some fungal growth and their toxins production. *International Journal of Advances in Biology* 2: 1–22.
- Hermann, K. L., Costa, A., Helm, C. V., Lima, E. A. and Tavares, L. B. B. 2013. Expression of manganese peroxidase by *Lentinula edodes* and *Lentinula boryana* in solid state and submerged system fermentation. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* 85: 965–973.
- Hernandez, C. A., Perroni, Y., Perez, J. A. G., Rivera, B. G. and Alarcon, E. 2016. Light-induced inhibition of laccase in *Pycnoporus sanguineus*. *Folia Microbiologica* 61:137–142.
- Ho, C. L. and Tan, Y. C. 2015. Molecular defense response of oil palm to *Ganoderma* Infection. *Phytochemistry* 114: 168–177.
- Ho, Y. W. and Nawawi, A. 1985. *Ganoderma boninense* Pat. From basal stem rot of oil palm (*Elaeis guineensis*) in Peninsular Malaysia. *Pertanika* 8: 425–428.
- Howell, C. R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87: 4–10.
- Hu, X., Wang, C. Y., Wang, L., Zhang, R. R. and Chen, H. 2014. Influence of temperature, pH and metal ions on guaiacol oxidation of purified laccase from *Leptographium qinlingensis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30: 1285–1290.
- Hushiaran, R., Yusof, N. A. and Dutse, S. W. 2013. Detection and control of *Ganoderma boninense*: strategies and perspectives. *SpringerPlus* 2: 555–567.

- Ikubar, M. R. M., Manan, M. A., Salleh, M. M. and Yahya, A. 2018. Solid-state fermentation of oil palm frond petiole for lignin peroxidase and xylanase-rich cocktail production. *3 Biotech* 8: 259–270.
- Intana, W., Kheawleng, S. and Sunpapao, A. 2021. *Trichoderma asperellum* T76-14 released volatile organic compounds against postharvest fruit rot in Muskmelons (*Cucumis melo*) caused by *Fusarium incarnatum*. *Journal of Fungi* 7: 1–13.
- Isroi, Millati, R., Syamsiah, S., Niklasson, C., Cahyanto, M. N., Lundquist, K. and Taherzadeh, M. J. 2011. Biological pretreatment of lignocelluloses with white-rot fungi and its applications: a review. *Bioresour* 6: 5224–5259.
- Jo, W. S., Cho, Y. J., Cho, D. H., Park, S. D., Yoo, Y. B. and Seok, S. J. 2009. Culture conditions for the mycelial growth of *Ganoderma applanatum*. *Mycobiology* 37: 94–102.
- Jonathan, S. G., Fasidi, I. O. and Ajayi, E. J. 2004. Physico-chemical studies on *Volvariella esculenta* (Mass) Singer, a Nigerian edible fungus. *Food Chemistry* 85: 339–342.
- Jordaan, J. and Leukes, W. D. 2003. Isolation of a thermostable laccase with DMAB and MBTH oxidative coupling activity from a mesophilic white rot fungus. *Enzyme Microbial Technology* 33: 212–219.
- Keiblinger, K. M., Bauer, L. M., Deltedesco, E., Holawe, F., Unterfrauner, H., Zehetner, F. and Peticzka, R. 2016. Quicklime application instantly increases soil aggregate stability. *International Agrophysics* 30: 123–128.
- Kishore, D., Kundu, S. and Kayastha, A. M. 2012. Thermal, chemical and pH induced denaturation of a multimeric β -galactosidase reveals multiple unfolding pathways. *PLOS ONE* 7 (11): 1–9.
- Kresnawaty, I., Eris, D. D., Mulyatni, A. S. and Prakoso, H. T. 2018. Inhibitory effect of phenolic acid on *Ganoderma boninense* enzyme as an approach on *Ganoderma* infection. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 183: 1–7.
- Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Borner, T. and Gueho, E. 1999. Molecular reidentification of human pathogenic *Trichoderma* isolates as *Trichoderma longibrachiatum* and *Trichoderma citrinoviride*. *Medical Mycology* 37: 25–33.

- Kulkarni, V. S., Butte, K. D. and Rathod, S. S. 2012. Natural polymers- A comprehensive review. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences* 3: 1597–1613.
- Kuwahara, M., Glenn, J. K., Morgan, M. A. and Gold, M. H. 1984. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂- dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters* 169: 247–250.
- Li, X. and Yu, H. Y. 2013. Characterization of a halostable endoglucanase with organic solvent-tolerant property from *Haloarcula* sp. G10. *International Journal of Biological Macromolecules* 62: 101–106.
- Li, G., Wang, Y., Zhu, P., Zhao, G., Liu, C. and Zhao, H. 2022. Functional characterization of laccase isozyme (PoLcc1) from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* involved in lignin degradation in cotton straw. *International Journal of Molecular Sciences* 23: 1–16.
- Luangharn, T. Karunarathna, S. C., Mortimer, P. E. Hyde, K. D., Thonhklang, N. and Xu, J. 2019. A new record of *Ganoderma tropicum* (Basidiomycota, Polyporales) for Thailand and first assessment of optimum conditions for mycelia production. *MycoKeys* 51: 65–83.
- Madihah, A. Z., Idris, A. S. and Rafidah, A. R. 2014. Polyclonal antibodies of *Ganoderma boninense* isolated from Malaysian oil palm for detection of basal stem rot disease. *African Journal of Biotechnology* 13: 3455–3463.
- Magday, Jr. J. C., Bungihan, M. E. and Dulay, R. M. R. 2014. Optimization of mycelial growth and cultivation of fruiting body of Philippine wild strain of *Ganoderma lucidum*. *Current Research in Environmental & Applied Mycology* 4: 162–172.
- Manan, W. N. A. and Aziz, Optimization of soil pH by using calcium carbonate (CaCO₃) obtained from seashell waste. *GADING Journal of Science and Technology* 1: 81–86.
- Manavalan, T., Manavalan, A., Thangavelu, K. P. and Heese, K. 2015. Characterization of a novel endoglucanase from *Ganoderma lucidum*. *Journal of Basic Microbiology* 55: 761–771.

- Mathur, P., Sanyal, D. and Dey, P. 2021. Optimization of growth conditions for enhancing the production of microbial laccase and its application in treating antibiotic contamination in wastewater. 3 Biotech 11: 1–15.
- Mayer, A. M. 2006. Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review. Phytochemistry 67: 2318–2331.
- Mehboob, N., Asad, M. J., Imran, M., Gulfraz, M., Wattoo, F. H., Hadri, S. H. and Asghar, M. 2011. Production of lignin peroxidase by *Ganoderma lucidum* using solid state fermentation. African Journal of Biotechnology 10: 9880–9887.
- Moncalvo, J. F. and Ryvarden, F. 1998. Nomenclature of *Ganodermataceae*. In Synopsis Fungorum 11: 1–109.
- Mood, S. H., Golfeshan, A. H., Tabatabaei, M., Jouzani, G. S., Najafi, G. H., Gholami, M. and Ardjmand, M. 2013. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. Renewable and Sustainable Energy Review 27: 77–93.
- Muniroh, M. S., Nusaibah, S. A., Vadamalai, G. and Siddique, Y. 2019. Proficiency of biocontrol agents as plant growth promoters and hydrolytic enzyme producers in *Ganoderma boninense* infected oil palm seedlings. Current Plant Biology 20: 1–9.
- Musa, H., Hassan, M. A., Isyaku, M. S., Halidu, J. and Suleiman, A. 2017. Antagonistic potential of *Trichoderma* species against *Ganoderma* disease of oil palm. Nigerian Journal of Agriculture, Food and Environment. 13: 60–67.
- Mycobank. *Ganoderma boninense*. (Online). Available: [https://www.mycobank.org/Simple/Ganoderma boninense/](https://www.mycobank.org/Simple/Ganoderma%20boninense/) (5 April 2024)
- Naher, L., Yusuf, U. K., Habib, S. H., Ky, H. and Siddiquee, S. 2018. Mycoparasitism activity of *Trichoderma harzianum* associated with chitinase expression against *Ganoderma boninense*. Pakistan Journal of Botany 50: 1241–1245.
- Ogeh, J. S., Imogie, A. E. and Maduakor, C. S. 2021. The micronutrient status of some soils supporting oil palm plantation in Nifor, Benin city, Benin. Bayero Journal of Pure and Applied Sciences 14: 95–99.

- Ollikka, P., Alhonmaki, K., Leppanen, V. M., Glumoff, T., Rajola, T. and Suominen, I. 1993. Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology 59: 4010–4016.
- Patel, H., Gupte, S., Gahlout, M. and Gupte, A. 2014. Purification and characterization of an extracellular laccase from solid-state culture of *Pleurotus ostreatus* HP-1. 3 Biotech 4: 77–84.
- Paterson, R. R. M. 2007. *Ganoderma* disease of oil palm-a white rot perspective necessary for integrated control. Crop Protection 26: 1369–1376.
- Paterson, R. R. M., Meon, S., Abidin, M. a. Z. and Lima, N. 2008. Prospects for inhibition of lignin degrading enzymes to control *Ganoderma* white rot of oil palm. Current Enzyme Inhibition 4: 172–179.
- Paterson, R. R. M., Meon, S. and Lima, N. 2009. The feasibility of producing oil palm with altered lignin content to control *Ganoderma* disease. Journal of Phytopathology 157: 649–656.
- Peng, S. H. T., Yap, C. K., Ren P. F. and Chai, E. W. 2019. Effect of environment and nutritional conditions on mycelial growth of *Ganoderma boninense*. International Journal of Oil Palm 2: 95–107.
- Phoka, N., Suwannarach, N., Lumyong, S., Ito, S. I., Matsui, K., Arikrit, S. and Sunpapao, A. 2020. Role of volatiles from the Endophytic fungus *Trichoderma asperelloides* PSU-P1 in biocontrol potential and in promoting the plant growth of *Arabidopsis thaliana*. Journal of Fungi 6: 1–15.
- Rahman, K. A. and Othman, R. 2020. Influence of pH levels on disease development in oil palm seedling roots infected with *Ganoderma boninense*. Rhizosphere 13: 100181.
- Rani, E., Mohshim, S. A., Yusof, N. H., Ahmad, M. Z., Goodacre, R., Ahmad, S. A. A. and Wong, L. S. 2020. Sensitive and selective detection of DNA fragments associated with *Ganoderma boninense* by DNA-nanoparticle conjugate hybridisation. Journal of Materials Science 55: 14965–14979.

- Rakib, M. R. M., Bong, C. F. J., Khairulmazmi, A., Idris, A. S., Jalloh, M. B. and Ahmed, O. H. 2017. Association of copper and Zinc levels in oil palm (*Elaeis guineensis*) to the spatial distribution of *Ganoderma* species in the plantation on peat. *Journal of Phytopathology* 165: 276–282.
- Rees, R. W., Flood, J., Hasan, Y. and Cooper, R. M. 2007. Effects of inoculum potential, shading and soil temperature on root infection of oil palm seedlings by the basal stem rot pathogen *Ganoderma boninense*. *Molecular Plant Pathology* 56: 862–870.
- Rees, R. W., Flood, J., Hasan, Y., Potter, U. and Cooper, R. M. 2009. Basal stem rot of oil palm (*Elaeis guineensis*); mode of root infection and lower stem invasion by *Ganoderma boninense*. *Plant Pathology* 58: 982–989.
- Rosales-Saavedra, T., Esquivel-Naranjo, E. U., Casas-Flores, S., Martinez-Hernandez, P., Ibarra-Laclette, E., Cortes-Penagos, C. and Herrera-Estrella, A. 2006. Novel light-regulated genes in *Trichoderma atroviride*: a dissection by cDNA microarrays. *Microbiology* 152: 3305–3317.
- Rosconi, F., Fraguas, L. F., Martinez-Drets, G. and Castro-Sowinski, S. 2005. Purification and characterization of a periplasmic laccase produced by *Sinorhizobium meliloti*. *Enzyme and Microbial Technology* 36: 800–807.
- Sanglimsuwan, S., Yoshida, N., Morinaga, T. and Murooka, Y. 1993. Resistance to and uptake of heavy metals in mushrooms. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 75:112–114.
- Shakeri, J. and Foster, H. A. 2007. Proteolytic activity and antibiotic production by *Trichoderma harzianum* in relation to pathogenicity to insects. *Enzyme and Microbial Technology* 40: 961–968.
- Shariffah-Muzaimah, S. A., Idris, A. S., Madihah, A. Z., Dzolkhifli, O., Kamaruzzaman, S. and Cheong, P. C. H. 2015. Isolation of actinomycetes from rhizosphere of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) for antagonism against *Ganoderma boninense*. *Journal of Oil Palm Research* 27: 19–29.

- Shu, C. H., Xu, C. J. and Lin, E. S. 2006. Production, purification and partial characterization of a novel endo- β -1,3-glucanase from *Agaricus brasiliensis*. *Process Biochemistry* 41, 1229–1233.
- Siddiqui, S., Alamri, S. A., Alrumman, S. A., Meghvansi, M. K., Chaudhary, K. K., Kilany, M. and Prasad, K. 2015. Role of soil amendment with micronutrients in suppression of certain soilborne plant fungal diseases: A review. In: *Organic Amendments and Soil Suppressiveness in Plant Disease Management*, *Soil Biology* 46: 363–380.
- Siddiqui, Y. Surendran, A. and Fishal, E. M. M. 2019. Inhibition of lignin degrading enzymes of *Ganoderma* spp.: An alternative control of basal stem rot disease of oil palm. *International Journal of Agriculture and Biology* 22: 523–530.
- Sim, C. S. F., Cheow, Y. L., Ng, S. L. and Ting, A. S. Y. 2019. Antifungal activities of metal-tolerant endophytes against *Ganoderma boninense* under the influence of metal stress. *Biological Control* 130: 9–17.
- Singh, G. 1991. Ganoderma-the scourge of oil palms in the coastal areas. *The Planter* 67: 421–444.
- Singh, R., Shukla, A., Tiwari, S. and Srivastava, M. 2014. A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. *Renewable and Sustainable Energy Review* 32: 713–728.
- Sivaramanan, S. 2014. Biodegradation of saw in plant fertilizer. *Research Journal of Agriculture and Forestry Sciences* 2: 13–19.
- Sivasakthivelan, P. 2013. Decolorization of textile dyes and their effluents using white rot fungi. *International Journal of ChemTech Research* 5: 1309–1312.
- Souza, C. G. M. D., Tychanowicz, G. K., Souza, D. F. D. and Peralta, R. M. 2004. Production of laccase isoforms by *Pleurotus pulmonarius* in response to presence of phenolic and aromatic compounds. *Journal of Basic Microbiology* 44: 129–136.
- Snajdr, J. and Baldrian, P. 2007. Temperature affects the production, activity and stability of ligninolytic enzymes in *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor*. *Folia Microbiologica* 52: 498–502.

- Stapleton, J. J., Wilen, C. A. and Molinar, R. H. 2019. Soil solarization for gardens and landscapes. In UC IPM Pest Notes: 1–6.
- Sun, S., Zhang, Y., Que, Y., Liu, B., Hu, K. and Xu, L. 2013. Purification and characterization of fungal laccase from *Mycena purpureofusca*. Chiang Mai Journal of Science 40: 151–160.
- Sundram, S. 2013. The effects of *Trichoderma* in surface mulches supplemented with conidial drenches in the disease development of *Ganoderma* basal stem rot in oil palm. Journal of Oil Palm Research 25: 314–325.
- Surendran, A., Siddiqui, Y., Saud, H. M., Ali, N. S. and Manickam, S. 2018. Inhibition and kinetic studies of lignin degrading enzymes of *Ganoderma boninense* by naturally occurring phenolic compounds. Journal of Applied Microbiology: 1364–5072.
- Susanto, A., Sudharto, P. S. and Purba, R. Y. 2005. Enhancing biological control of basal stem rot disease (*Ganoderma boninense*) in oil palm plantations. Mycopathologia 159: 153–157.
- Taiz, L., Zeiger, E., Moller, I. M. and Murphy, A. 2014. Plant physiology and development. Oxford University press. England.
- Tejirian, A. and Xu, F. 2010. Inhibition of cellulase-catalyzed lignocellulosic hydrolysis by iron and oxidative metal ions and complexes. Applied and Environmental Microbiology 76: 7673–7682.
- Turner, P. D. 1981. Oil palm diseases and disorders. Kuala Lumpur Malaysia: Oxford University Press: pp. 280.
- Uexkull, H. R. and Fairhurst, T. H. 1991. Fertilizing for high yield and quality. The Oil Palm. International Potash Institute, Bern, Switzerland. pp. 79.
- Vandana, T., Kumar, S. A., Swaraj, S. and Manpal, S. 2019. Purification, characterization and biodelignification potential of lignin peroxidase from immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. BioResources 14: 5380–5399.

- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., and Lorito, M. 2008. *Trichoderma* plant pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry* 4: 1–10.
- Viterbo, A., Wiest A., Brotman, Y., Chet, I. and Kenerley, C. 2007. The 18mer peptaibols from *Trichoderma virens* elicit plant defence responses. *Molecular Plant Pathology* 8: 737–746.
- Wang, P., Hu, X., Cook, S., Begonia, M., Lee, K. S. and Hwang, H. M. 2008. Effect of culture conditions on the production of ligninolytic enzymes by white rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* (ATCC 20696) and separation of its lignin peroxidase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24: 2205–2212.
- Wariishi, H., Valli, K. and Gold, M. H. 1992. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, Kinetic mechanism and role of chelators. *Journal of Biology and Chemistry* 267: 23688–23695.
- Wonglom, P., Suwannarach, N., Lumyong, S., Ito, S. I., Matsui, K. and Sunpapao, A. 2019. *Streptomyces angustmyceticus* NR8-2 as a potential microorganism for the biological control of leaf spots of *Brassica rapa* subsp. *Pekinensis* caused by *Colletotrichum* sp. and *Curvularia lunata*. *Biological control* 138: 1–7.
- Woo, S. L. and Lorito, M. 2007. Exploiting the interactions between fungal antagonists, pathogens and the plant for biocontrol. In: *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*, Vurro, M. and Gressel, J., (eds). pp. 107–130.
- Yu, G. and Chong, K. 2018. Selected biomarkers from oil palm-*Ganoderma* infected tissues for detection of basal stem rot disease. *WMSU Research Journal* 37: 1–13.
- Zadrazil, F. and Brunnert, H. 1981. Investigation of physical parameters important for the solid state fermentation of straw by white rot fungi. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 11: 183–188.
- Zhang, W. and Tang, Y. 2008. Biocatalysts and bioreaction design. *Biotechnology Progress* 28: 1249–1261.

Zhao, H. B., Kwak, J. H., Zhang, Z. C., Brown, H. M., Arey, B. W. and Holladay, J. E. 2007.
Studying cellulose fiber structure by SEM, XRD, NMR and acid hydrolysis.
Carbohydrate Polymers 68: 235–241.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นางสาวศรัณยา อินทรอนันต์

รหัสประจำตัวนักศึกษา 6310620020

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกษตรศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2563

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

- ศูนย์วิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ ระยะที่ 3 คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- ทุนผู้ช่วยสอนบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน (ถ้ามี)

ศรัณยา อินทรอนันต์ และธนัญชนก ไชยรินทร์. 2564. ผลของจุลธาตุของพืชต่อกิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของ *Ganoderma boninense* สาเหตุโรคลำต้นเน่าในปาล์มน้ำมัน. วารสารแก่นเกษตร 49 (ฉบับพิเศษ 1): 827–831.

ศรัณยา อินทรอนันต์ และธนัญชนก ไชยรินทร์. 2566. อิทธิพลของอุณหภูมิ และแสงที่ส่งผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของรา *Ganoderma boninense* ในสภาพห้องปฏิบัติการ. วารสารแก่นเกษตร 51 (ฉบับเพิ่มเติม 1): 624–629.

Anothai, J., Intara-anun, S., Samlikamnoed, P. and Chairin, T. 2023. Understanding factors influencing growth and lignocellulosic enzyme of *Ganoderma* for developing integrated control strategies for basal stem rot disease in oil palm. Tropical Plant Pathology 48: 154–162.