

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอัลคาไลน์โปรติเอสกับการย่อยตัวเองของ *A. oryzae* U1521 พบว่าเมื่อเติม crude alkaline protease ที่ผลิตจาก *A. oryzae* U1521 ลงในเซลล์ *A. oryzae* U1521 มีผลทำให้เซลล์เกิดการย่อยตัวเอง แสดงว่าอัลคาไลน์โปรติเอสเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เซลล์เกิดการย่อยตัวเอง และเมื่อเลี้ยงราในสูตรอาหารพื้นฐานที่ประกอบด้วย 10 กรัมต่อลิตร defatted soybean 5 กรัมต่อลิตร แลคโตส 5 กรัมต่อลิตร  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  และ 1 กรัมต่อลิตร แคซิโตน ที่ pH เริ่มต้น 5.0 พบการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสและการย่อยตัวเองของราเช่นเดียวกับในอาหาร synthetic medium ที่ใช้ฮีสทีดินเป็นแหล่งไนโตรเจน แต่เมื่อเลี้ยงราในอาหาร synthetic medium ที่ใช้เมทไธโอนีนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ pH เริ่มต้น 5.0 และไม่ควบคุม pH ไม่พบการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสและการย่อยตัวเองของรา ซึ่งสรุปว่าอัลคาไลน์โปรติเอสเกี่ยวข้องกับการย่อยตัวเองของ *A. oryzae* U1521

การศึกษาปัจจัยทางกายภาพที่เปลี่ยนแปลงในช่วงที่เกิดการย่อยตัวเองของ *A. oryzae* U1521 ได้แก่ การลดลงของน้ำหนักเซลล์แห้งและการปลดปล่อยแอมโมเนีย พบว่าในสูตรอาหารที่พบการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสคือ อาหารพื้นฐาน (pH เริ่มต้น 5.0) และอาหาร synthetic medium ที่ใช้ฮีสทีดินเป็นแหล่งไนโตรเจน (pH เริ่มต้น 5.0) หรือใช้เมทไธโอนีนเป็นแหล่งไนโตรเจน (ควบคุม pH 5.0 ตลอดการทดลอง) พบการย่อยตัวเองของราเกิดขึ้นพร้อมกับการลดลงของน้ำหนักเซลล์แห้งและการปลดปล่อยแอมโมเนีย อย่างไรก็ตามสามารถพบการปลดปล่อยแอมโมเนียในสูตรอาหารพื้นฐานขณะรากำลังเจริญเติบโตเนื่องจากการใช้ defatted soybean ผ่านกระบวนการ deamination สำหรับสูตรอาหารที่ใช้เมทไธโอนีนเป็นแหล่งไนโตรเจน (pH เริ่มต้น 5.0) และไม่ควบคุม pH

ซึ่งไม่พบการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสและการย่อยตัวเอง ไม่พบการลดลงของน้ำหนักเซลล์แห้งและการปลดปล่อยแอมโมเนีย

การศึกษาเอ็นไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลสคือโคติเนส  $\beta$ -1,3-glucanase และ  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase ในอาหารเลี้ยงเชื้อกับการย่อยตัวเองของ *A. oryzae* U1521 เปรียบเทียบระหว่างสูตรอาหารที่พบและไม่พบการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอส ในสูตรอาหารที่พบการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสคือ สูตรอาหารพื้นฐาน (pH เริ่มต้น 5.0) พบกิจกรรมของโคติเนส  $\beta$ -1,3-glucanase และ  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase ช่วงที่เซลล์เริ่มเกิดการย่อยตัวเอง และในอาหาร synthetic medium ที่ใช้ฮีสทีดีน (pH เริ่มต้น 5.0) หรือเมทาโซอินีน (ควบคุม pH 5.0 ตลอดการทดลอง) เป็นแหล่งไนโตรเจน พบกิจกรรมของ  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase ก่อนพบการย่อยตัวเอง ส่วนกิจกรรมของโคติเนส และ  $\beta$ -1,3-glucanase พบในช่วงที่เกิดการย่อยตัวเอง สำหรับในสูตรอาหารที่ไม่พบการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสคือ อาหารที่ใช้เมทาโซอินีนเป็นแหล่งไนโตรเจน (pH เริ่มต้น 5.0 และไม่ควบคุม pH) ไม่พบการย่อยตัวเองและกิจกรรมของเอ็นไซม์ไฮโดรเลสทั้ง 3 ชนิด เช่นเดียวกับในอาหารที่ใช้แลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน (ควบคุม pH 5.0 ตลอดการทดลอง) ที่ไม่พบอัลคาไลน์โปรติเอส ไม่พบการย่อยตัวเองรวมทั้งโคติเนส และ  $\beta$ -1,3-glucanase แต่พบกิจกรรมของ  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase แสดงว่าโคติเนส และ  $\beta$ -1,3-glucanase มีความสัมพันธ์กับการย่อยตัวเองของ *A. oryzae* U1521 ส่วน  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase สันนิษฐานเบื้องต้นว่าไม่เกี่ยวข้องกับการย่อยตัวเองในราชนิดนี้

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงของ *A. oryzae* U1521 ภายใต้อุณหภูมิที่ลดลงพบว่าเมื่อเซลล์ที่จับตัวกันเป็นกลุ่มก้อนหนาแน่นที่เรียกว่า pellet เริ่มมีการคลายตัวและจับกันแบบหลวม ๆ เป็นลักษณะที่ร่ากำลังเกิดกระบวนการย่อยตัวเองและหลังจากนี้พบเส้นใยที่แตกหักปลายเปิดภายในว่างเปล่า ซึ่งเป็นลักษณะที่แสดงว่ามีการย่อยตัวเองเพิ่มขึ้น และเมื่อใช้เทคนิค Image analysis ติดตามการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาพบว่าเทคนิคนี้สามารถติดตามการย่อยตัวเอง ของ *A. oryzae* U1521 นับตั้งแต่เริ่มเกิดการย่อยตัวเองได้ดีทั้งที่ขณะนั้นเซลล์ส่วนใหญ่ยังมีการเจริญเติบโตอยู่เป็นผลให้สามารถอธิบายปรากฏการณ์ต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในช่วงที่เราเกิดการย่อยตัวเองได้ถูกต้องยิ่งขึ้น

The objective of the work is to study the relationship between alkaline protease production and autolysis of *A. oryzae* U1521. When crude alkaline protease was added into the cells, autolysis of the cells was found. This confirmed that alkaline protease is a factor caused autolysis of *A. oryzae* U1521. Cells in a complex medium (10 g/L defatted soybean, 5 g/L lactose, 5 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and 1 g/L casitone) at initial pH 5.0 were found to produce alkaline protease and autolysis of the cells. Similarly, when the cultures were cultivated in a synthetic medium which histidine was used as a nitrogen source, alkaline protease was produced together with the autolysis of the cells. But in the methionine containing synthetic medium without pH controlling, no alkaline protease and autolysis of the cells could be detected. The results showed that alkaline protease involved autolysis of *A. oryzae* U1521.

The physiological changes during occurrence of autolysis such as declining of cell dry weight and releasing of ammonium were studied. Declining of cell dry weight and releasing of ammonium were found in cultures grown in complex medium and synthetic medium which used histidine (initial pH 5.0) or methionine (control pH at 5.0 throughout fermentation time) as a nitrogen source. Autolysis and alkaline protease were found in these media. However, the releasing of ammonium is not a good indicator for autolysis since it could also be detected in the culture growing in complex medium due to deamination of amino acids in defatted soybean. In the methionine synthetic

medium that cells did not produce alkaline protease, declining of cell dry weight and the releasing of ammonium weren't found in the medium.

Excretion of hydrolase enzymes, chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase and  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase during the autolysis phase was detected during fermentation. Results were compared between alkaline protease production medium and non-alkaline protease production medium. The first are complex medium and synthetic medium, which used histidine (initial pH 5.0) or methionine (control pH 5.0 throughout fermentation time), as a nitrogen source. The second is non-alkaline protease production media, which used methionine as nitrogen source (initial pH 5.0) or the medium that used lactose as a carbon source and  $\text{NH}_4\text{Cl}$  as a nitrogen source (control pH 5.0 throughout fermentation time). It was found that  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase could be detected only when autolysis of the cells was found during secretion of alkaline protease. Whereas  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase could be detected before the occurrence of autolysis in all media, except in the medium which methionine was used as a nitrogen source (initial pH 5.0) due to pH effect. From these results, they are suggested that chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase involved in the autolysis of *A. oryzae* U1521 and presumably that  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase may not be a factor caused autolysis of the cells.

The morphological change during the process of autolysis in *A. oryzae* U1521 was monitored under microscope. Beginning sign of autolysis is the pellet of cells became loose and pellet form was degraded into hyphae fragments which shown as open-ended hypha tubes. Image analysis techniques have been used to visualize culture morphology and to assess the proportion of the autolysis culture. The method showed clear signs of autolysis although the cultures grew in growth phase. It is then suggested that image analysis technique is the most useful technique for determination the autolysis process in the cultures.