วิทยานิพนธ์นี้ศึกษาวิธีการผลิตเอนไซม์แอซิดโปรติเอสและอะไมเลสจาก *Aspergillus niger* ในการหมักแบบอาหารแข็ง การศึกษาอัตราส่วนของกากมันสำปะหลังและกากถั่วเหลืองที่ใช้เลี้ยงเชื้อ พบว่าอัตราส่วนโดยน้ำหนักของกากมันสำปะหลังและกากถั่วเหลืองที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์คือ 60:40 เวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง สภาวะการเลี้ยงเชื้อความชื้นร้อยละ 60 อุณหภูมิ 30°C และ pH เริ่มต้น 5 โดยสามารถผลิตเอนไซม์แอซิดโปรติเอสและอะไมเลสได้ 1349 Unit/g. อาหารแห้ง และ 107141 Unit/g. อาหารแห้ง ตามลำดับ

การศึกษาการสกัดเอนไซม์ออกจากอาหารแข็ง พบว่าการใช้โซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.5 ในสารละลายฟอสเฟตซิเตดบัฟเฟอร์ pH 4 ในระหว่างการสกัดเอนไซม์ ทำให้สกัดเอนไซม์แอซิดโปรติเอสและอะไมเลสได้สูงขึ้นร้อยละ 6.89 และ 4.69 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการสกัดด้วยการสกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เพียงอย่างเดียว เมื่อนำสารละลายเอนไซม์ดิบไปทดสอบการเก็บรักษา พบว่าที่อุณหภูมิ –20°C และ 4°C สามารถเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ได้อย่างน้อย 120 วัน โดยไม่สูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ แต่เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30°C จะเริ่มสูญเสียกิจกรรมตั้งแต่การเก็บ 15 วัน

การตกตะกอนเอนไซม์โดยใช้อะซิโตน เอทานอล และแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าอัตราส่วนของสารละลายเอนไซม์ดิบต่ออะซิโตนที่เหมาะสมคือ 1:2 อัตราส่วนสารละลายเอนไซม์ดิบต่อเอธานอลที่เหมาะสมคือ 1:3 และความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอมโมเนียมซัลเฟตในการตกตะกอนเอนไซม์คือร้อยละ 70 ของความเข้มข้นอิ่มตัว และเมื่อเปรียบเทียบการตกตะกอนด้วยสารตกตะกอนแต่ละชนิด พบว่าการใช้อะซิโตนในสัดส่วนสารละลายเอนไซม์ดิบต่ออะซิโตน 1:2 ในการตกตะกอนเอนไซม์แล้วนำไปทำให้แห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็งจะได้เอนไซม์ผง และให้เอนไซม์ผงที่มีกิจกรรมและความบริสุทธิ์ที่สูง ในขณะที่มีค่าใช้จ่ายจากสารเคมีต่ำกว่าการใช้สารตกตะกอนชนิดอื่นๆ โดยให้ผลผลิตแอซิดโปรติเอสและอะไมเลส ร้อยละ 74.18 และ 73.81 ของเอนไซม์ตั้งต้นตามลำดับ และได้ความบริสุทธิ์ของแอซิดโปรติเอสสูงขึ้น 4.98 เท่า และ 5.00 เท่า ตามลำดับ

เอนไซม์ผงที่ผลิตได้มีสภาวะการทำงานที่เหมาะสมที่ 60°C pH 3.0 และ 60°C pH 4.0 สำหรับแอซิดโปรติเอสและอะไมเลสตามลำดับ เมื่อเจือจางให้เป็นสารละลาย เอนไซม์ที่ผลิตได้มีความคงทนที่ช่วง pH 4.0 ถึง 5.0 และ 5.0 ถึง 6.0 สำหรับแอซิดโปรติเอสและอะไมเลสตามลำดับ มีความคงทนที่อุณหภูมิ 60°C และ 65°C สำหรับแอซิดโปรติเอสและอะไมเลส ตามลำดับ ที่เวลา 30 นาที และที่เวลา 3 ชั่วโมง เอนไซม์แอซิดโปรติเอสและอะไมเลสที่ผลิตได้จะมีความคงทนที่อุณหภูมิ 40°C เมื่อเปรียบเทียบความคงทนต่ออุณหภูมิของเอนไซม์แอซิดโปรติเอสและอะไมเลสจากค่า K_i (inactivation coefficients) พบว่าที่อุณหภูมิเดียวกันเอนไซม์อะไมเลสมีความคงทนต่ออุณหภูมิสูงกว่าเอนไซม์แอซิดโปรติเอส เมื่อเก็บเอนไซม์ผงที่ผลิตได้ที่ –20°C 4°C และ 30°C พบว่าสามารถเก็บไว้ได้อย่างน้อย 120 วัน โดยไม่สูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์

In this research, the production of acid proteases and amylases from *Aspergillus niger* in solid state fermentation were studied. The appropriate ratio of tapioca pulp and soybean pulp in the substrate were determined. The results showed that 60:40 ratio of tapioca pulp and soybean pulp gave the highest growth and enzyme production. Cultivation was performed at moisture content of 60 percent, 30°C and initial pH 5.0 for 48 hours. The maximum acid protease and amylase activities were 1349 Unit/g. dry substrate and 107141 unit/g. dry substrate, respectively.

The activities of acid proteases and amylases when extracted from substrate by 0.5 percent sodium chloride in phosphate citrate buffer pH 4 was higher than when extracted by only phosphate citrate buffer by 6.89 and 4.69 percent, respectively. The crude enzyme solution can be stored at –20°C and 4°C for at least 120 days without loosing any activity. But the activity dropped if the crude enzyme solution was stored at 30°C for 15 days.

The acid protease and amylase were precipitated by addition of acetone, ethanol and ammonium sulphate. It was found that the optimum ratio of crude enzyme solution and solvent were 1:2 and 1:3 for acetone and ethanol, respectively. In case of ammonium sulphate, maximum activity was obtained at 70 percent salt saturation. The acetone precipitation gave recovery yields of 74.18 and 73.81 percent and purity 4.98 folds and 5.00 folds for acid protease and amylase respectively, and there were the bast results when recovery, purity and economic benefit are concerned.

The activity of enzyme powder had optimum condition of pH 3.0, 60°C and pH 4.0, 60°C for acid proteases and amylases respectively. In the solution form, acid proteases and amylases were stable at pH range of 4.0 to 5.0 and 5.0 to 6.0 respectively. Acid proteases and amylases were quite stable when incubated for 30 minutes at 60°C and 65°C, respectively. However, the enzymes were quite stable when incubated at 40°C for 3 hours. K_i (inactivation cofficients) of both enzymes show that amylases were more stable than acid proteases at the same temperature. The enzyme powder can be stored at –20°C, 4°C and 30°C for at least 120 days without worse of their activity.