การผลิตและการประยุกต์แมนนาเนสจากจุลินทรีย์

Production and Application of Microbial Mannanases

สุดาทิพย์ จันทร* และชนิตโชต ปิยพิทยานันต์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Sudathip Chantorn* and Chanitchote Piyapittayanun

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,

Rangsit Centre, Klong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

แมนนาเนสเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายโพลิแซคคาไรด์ในกลุ่มแมนแนนและเฮทเทอโรแมนแนน ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์พืช และได้ผลผลิตเป็นแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์และแมนโนส แมนนาเนสได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมหลายประเภท พืชและสัตว์บางชนิดสามารถผลิตแมนนาเนสได้ แต่ที่ใช้กันมากในทางอุตสาหกรรมเป็นแมนนาเนสจากจุลินทรีย์ บทความนี้เน้นแมนนาเนสจากจุลินทรีย์ ในหัวข้อที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ กระบวนการผลิตเอนไซม์ การเพิ่มผลผลิตเอนไซม์โดยใช้เทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ และการประยุกต์แมนนาเนสในระดับอุตสาหกรรม

คำสำคัญ : แมนนาเนส, การผลิตแมนนาเนส, อุตสาหกรรมเอนไซม์

Abstract

A mannanase is an enzyme that hydrolyzes polysaccharides, mannans and heteromannans, which are components of plant cell walls, to produce mannooligosaccharides and mannose. This enzyme has stimulated intense attention recently due to its potential role in many industrial processes. Some plants and animals also produce mannanases however the major industrial uses are mannanases from microorganisms. This article focuses on the microbial mannanases regarding their enzyme production, overproduction by recombinant DNA technology, and potential applications in industries.

Keywords: mannanase, mannanase production, industrial enzyme

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** t_sudathip@yahoo.com หรือ sudathip@tu.ac.th

1. บทนำ

ปัจจุบันการศึกษาทางเอนไซม์วิทยาให้ความสำคัญกับการศึกษาเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมทางเทคโนโลยีชีวภาพ (biotechnology industries) ซึ่งเป็นอุตสาหกรรมที่มีส่วนแบ่งทางการตลาดเพิ่มมากขึ้นทุกปี โดยในปี พ.ศ. 2553 ทั่วโลกมีการใช้เอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรมมีมูลค่าสูงถึง 3.3 พันล้านเหรียญสหรัฐ และมีการคาดการณ์ว่าในปี พ.ศ. 2558 จะมีการใช้เอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรมเพิ่มขึ้นเป็น 4.4 พันล้านเหรียญสหรัฐ [1] เอนไซม์ที่มีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพอย่างกว้างขวางในปัจจุบันแบ่งเป็นกลุ่มเอนไซม์ไฮโดรเลส (hydrolases) เช่นโปรติเอส (proteases) อะไมเลส (amylases) และเอสเทอเรส (esterases) และกลุ่มเอนไซม์คาร์โบไฮเดรส (carbohydrases) เช่น เซลลูเลส (cellulases) เฮมิเซลลูเลส (hemicellulases) และเพคติเนส (pectinases) [2] โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลสเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพอย่างกว้างขวาง [3]

โครงสร้างของเซลล์พืชเป็นสารกลุ่มลิกโนเซลลูโลส (lignocelluloses) ซึ่งประกอบด้วยเซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicelluloses) และลิกนิน (lignin) ในอัตราส่วน 2:1:1.0 [4] โดยเซลลูโลสเป็นส่วนที่ไม่ละลายน้ำ จัดเรียงตัวกันแน่นสร้างความแข็งแรงต่อโครงสร้างของผนังเซลล์พืช ในขณะที่ลิกนินเป็นสารอะโรมาติกจัดเรียงตัวเป็นชั้นๆ (aromatic barrier) มีหน้าที่ป้องกันการย่อยสลายจากจุลินทรีย์ ส่วนสารประกอบเฮมิเซลลูโลสเป็นสารที่อยู่ระหว่างชั้นของเซลลูโลสและลิกนิน โดยลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสแตกต่างกันที่สารประกอบเซลลูโลสเป็นสายโซ่ตรงของน้ำตาลกลูโคส (glucose) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 ในขณะที่สารประกอบเฮมิเซลลูโลสมีทั้งรูปแบบที่เป็นสายโซ่ตรงและโซ่กิ่งซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลที่แตกต่างกัน 5 ชนิด คือ กลูโคส ไซโลส (xylose) กาแลคโตส (galactose) แมนโนส (mannose) และอะราบิโนส (arabinose) ดังนั้นจึงสามารถแบ่งประเภทของสารประกอบเฮมิเซลลูโลสจากชนิดของน้ำตาลในสายโซ่หลักได้เป็นไซแลน (xylan) กาแลคแตน (galactan) และแมนแนน (mannan) โดยไซแลนเป็นองค์ประกอบหลักในพืชจำพวกไม้เนื้อแข็ง (hardwood) และพืชตระกูลหญ้าในขณะที่แมนแนนเป็นองค์ประกอบหลักในไม้เนื้ออ่อน (softwood) และเมล็ดพืชตระกูลถั่วซึ่งมีหน้าที่ทั้งที่เป็นส่วนของโครงสร้างและเป็นส่วนสะสมอาหาร [5]

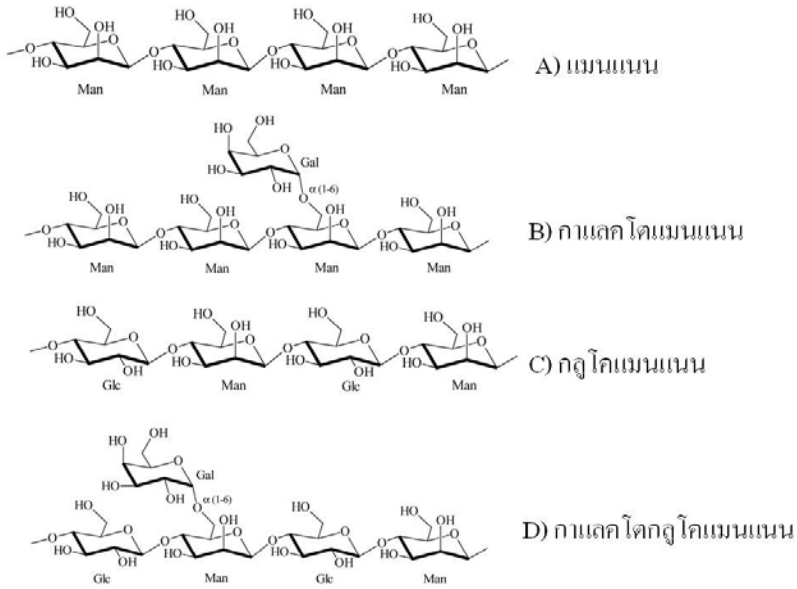
เอนไซม์เฮมิเซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่สามารถทำงานภายใต้สภาวะในช่วงพีเอชและอุณหภูมิกว้าง จึงมีการนำเอนไซม์เฮมิเซลลูเลสมาใช้ในอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะอย่างยิ่งแมนนาเนสที่สามารถย่อยสลายสารประกอบแมนแนนแบบสุ่มภายในสายของสารประกอบที่มีโครงสร้างหลักเป็นน้ำตาลแมนโนสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 การประยุกต์ใช้แมนนาเนสเริ่มต้นในอุตสาหกรรมกระดาษและเยื่อกระดาษ [6] ดังนั้นบทความวิจัยนี้จึงมุ่งถึงแมนนาเนสจากจุลินทรีย์ กระบวนการผลิต และการประยุกต์ใช้แมนนาเนสในระดับอุตสาหกรรมซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อผู้สนใจที่จะใช้เอนไซม์ในอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพ

2. โครงสร้างของสารประกอบแมนแนน

สารประกอบแมนแนนเป็นสารในกลุ่มเฮมิเซลลูโลส พบทั่วไประหว่างชั้นของเซลลูโลสและ

ลิกนิน โดยพบว่าแมนแนนจะยึดติดกับส่วนของลิกนินด้วยพันธะโควาเลนท์ และจะเชื่อมกับเส้นใยเซลลูโลสด้วยพันธะไฮโดรเจน จากลักษณะโครงสร้างดังกล่าวจึงช่วยสร้างความแข็งแรงและทำให้ยากต่อการย่อยสลาย [7] สารประกอบแมนแนนพบได้ทั่วไปในจิมโนสเปิร์มของไม้เนื้ออ่อน ส่วนแองจิโอสเปิร์มในไม้เนื้อแข็ง เมล็ดของพืชตระกูลถั่ว เมล็ดกาแฟ และสาหร่ายทะเลบางชนิด [8]

การแบ่งชนิดของสารประกอบแมนแนนสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ 1) กลุ่มที่มีน้ำตาลแมนโนสเพียงชนิดเดียวเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 ไม่มีสายโซ่กิ่ง และ 2) กลุ่มที่ประกอบด้วยน้ำตาลแมนโนสเป็นน้ำตาลหลักในสายโซ่ตรงเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 และมีน้ำตาลเฮกโซส (hexose) ตัวอื่นอยู่ในโครงสร้าง นั่นคือในโครงสร้างที่มีน้ำตาลแมนโนสและน้ำตาลกลูโคสอยู่ในสายโซ่ตรงเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 เรียกโครงสร้างดังกล่าวว่ากลูโคแมนแนน (glucomannan) และโครงสร้างที่มีน้ำตาลแมนโนสเป็นสายโซ่ตรงเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 และมีน้ำตาลกาแลคโตสเป็นสายโซ่กิ่งเชื่อมกับสายโซ่ตรงด้วยพันธะ α-1,6 เรียกโครงสร้างดังกล่าวว่ากาแลคโตแมนแนน (galactomannan) นอกจากนั้นในไม้เนื้ออ่อนบางชนิดพบโครงสร้างสารประกอบกาแลคโตแมนแนนที่มีน้ำตาลกลูโคสในสายหลักด้วย เรียกโครงสร้างนี้ว่ากาแลคโตกลูโคแมนแนน (galactoglucomannan) ดังรูปที่ 1 พืชแต่ละชนิดจะมีอัตราส่วนน้ำตาลแมนโนส : กาแลคโตสที่แตกต่างกัน คือ น้ำตาลแมนโนส : กาแลคโตสเท่ากับ 1.1:1.0 จัดอยู่ในพวกที่มีน้ำตาลกาแลคโตสมาก (high Gal) และ 3.5:1.0 คือพวกที่มีน้ำตาลกาแลคโตสน้อย (low Gal) ซึ่งปริมาณน้ำตาลกาแลคโตสที่เพิ่มมากขึ้นจะทำให้ความสามารถในการละลายได้ลดลง ตัวอย่างสารประกอบกาแลคโตแมนแนนในพืชชนิดต่างๆ แสดงดังตารางที่ 1



รูปที่ 1 โครงสร้างของแมนแนนและสารประกอบแมนแนน A) แมนแนน; B) กาแลคโตแมนแนน; C) กลูโคแมนแนน และ D) กาแลคโตกลูโคแมนแนน [ดัดแปลงจาก Dhawan และ Kaur (2007)] [5]

ตารางที่ 1 ตัวอย่างสารประกอบกาแลคโตแมนแนนในพืชชนิดต่างๆ (ดัดแปลงจาก Moreira and Filho, 2008) [7]

ชนิด	อัตราส่วน น้ำตาลแมนโนส : น้ำตาลกาแลคโตส
Schizolobium parahybum	3.0:1.0
Mimosa scabrella	1.1:1.0
Cyamopsis tetragonoloba	1.6-2.0:1.0
Caesalpinia spinosa	3.0:1.0
Ceratonia siliqua	4.0:1.0

สับสเตรตที่นิยมใช้ในการศึกษาการทำงานของแมนนาเนส คือ สารประกอบกาแลคโตแมนแนนจากโลคัสบีนกัม (locust bean gum, LBG) จาก *Ceratonia siliqua* ซึ่งมีอัตราส่วนน้ำตาลแมนโนส : น้ำตาลกาแลคโตส เท่ากับ 4:1 [9] กลูโคแมนแนนจากไอโวรีนัท (ivory nut) (*Phytelephas macrocarpa*) และแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ [10]

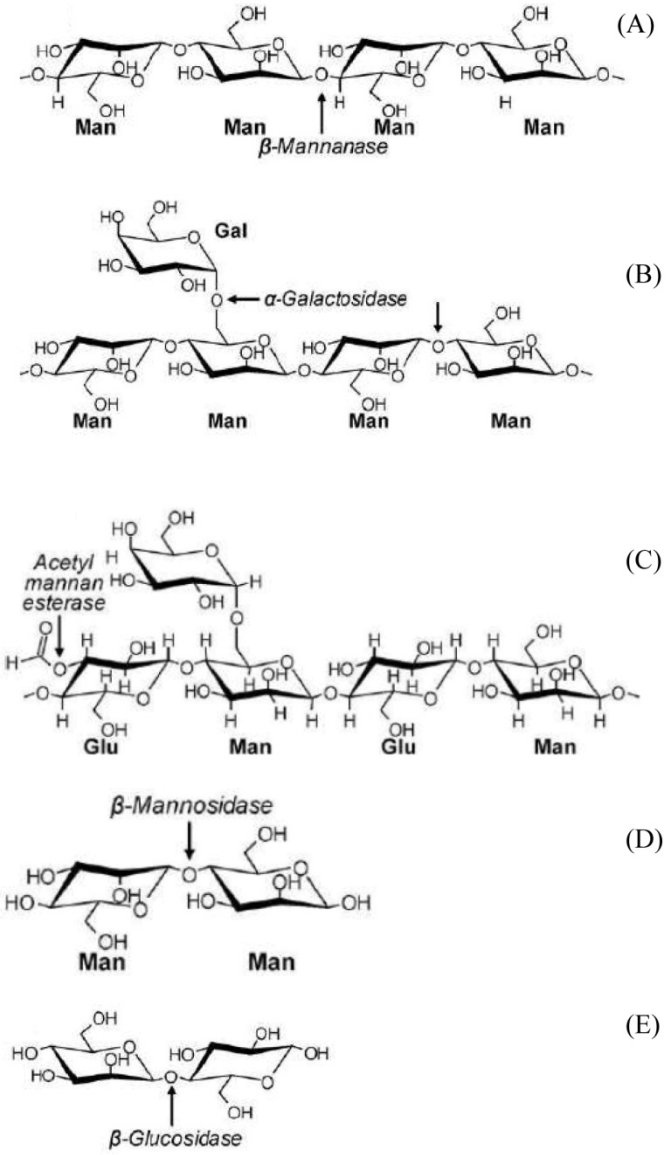
3. เอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบแมนแนน

ดังที่กล่าวข้างต้นว่า สารประกอบแมนแนนประกอบด้วยน้ำตาลแมนโนสเป็นโครงสร้างสายหลักและอาจมีน้ำตาลชนิดอื่นปนอยู่ในโครงสร้างด้วย ดังนั้นในการย่อยสลายสารประกอบแมนแนนอย่างสมบูรณ์จึงจำเป็นต้องใช้เอนไซม์อย่างน้อย 2 ชนิดทำงานร่วมกัน (synergistic action) คือแมนนาเนส (EC 3.2.1.78, mannan endo-1,4-mannosidase) และแมนโนซิเดส (EC 3.2.1.25, exo-mannosidase) โดยเอนไซม์ทั้งสองชนิดเป็นเอนไซม์หลักในการย่อยสลายสารประกอบแมนแนนให้สมบูรณ์ นอกจากนั้นยังอาจพบแอลฟา-กลูโคซิเดส (α-glucosidase; EC 3.2.1.21) แอลฟา-กาแลคโตซิเดส (α-galactosidase; EC 3.2.1.22) และอะซิติลแมนแนนเอสเทอร์เรส (acetyl mannan esterase) [11] ซึ่งเอนไซม์ทั้งสามชนิดทำหน้าที่ย่อยสลายโซ่กิ่งหรือองค์ประกอบน้ำตาลชนิดอื่นที่มิใช่น้ำตาลแมนโนส ตัวอย่างการย่อยสลายสารประกอบ แมนแนนโดยเอนไซม์ในกลุ่มแมนนาเนสแสดงดังรูปที่ 2

แมนนาเนสเป็นเอนไซม์ไฮโดรเลสที่ย่อยสลายแบบสุ่มภายในโครงสร้างที่มีน้ำตาลแมนโนสเป็นองค์ประกอบหลักเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 นั่นคือสารกาแลคโตแมนแนน กลูโคแมนแนน กาแลคโตกลูโคแมนแนน และแมนแนนทำให้ได้แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (mannan-oligosacharide) เป็นผลิตภัณฑ์ซึ่งอาจประกอบด้วยแมนโนไตรโอส (mannotriose) หรือแมนโนไบโอส (mannobiose) อย่างไรก็ตามบางครั้งจะพบกลไกการทำงานของแมนนาเนสแบบทรานไกลโคซิลเลชั่น (transglycosylation) นั่นคือปฏิกิริยาการย้ายหมู่น้ำตาลจากโมเลกุลหนึ่งไปอีกโมเลกุลหนึ่ง โดยมีแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์เป็นสับสเตรต [12]

ประสิทธิภาพการทำงานของแมนนาเนสขึ้นอยู่กับจำนวนการแทนที่ของน้ำตาลชนิดอื่นที่ไม่ใช่น้ำตาลแมนโนส นั่นคือในกรณีของสารประกอบกาแลคโตแมนแนนและกลูโคแมนแนนประสิทธิภาพ

การย่อยสลายของแมนนาเนสขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำตาลกาแลคโตสและกลูโคสในโมเลกุล [9] จากนั้นแมนโนซิเดสจะใช้แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์เป็นสับสเตรตย่อยสลายต่อ โดยแมนโนซิเดสจะย่อยสลายจากทางด้านปลายสายน้ำตาลแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีความจำเพาะกับพันธะβ-1,4 ทำให้ได้น้ำตาลแมนโนสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย



รูปที่ 2 โครงสร้างสารประกอบแมนแนนและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง (A) แมนนาเนสย่อยสลายแมนแนน (B) กาแลคโตซิเดสย่อยสลายกาแลคโตแมนแนน (C) อะซิติลแมนแนนเอสเทอร์เรสย่อยสลายกาแลคโตกลูโคแมนแนน (D) แมนโนซิเดสย่อยสลายแมนแนนสายสั้น (E) กลูโคซิเดสย่อยสลายกลูโคโอลิโกแซคคาไรด์ [ดัดแปลงจาก Zyl และคณะ (2010)] [4]

4. แหล่งของแมนนาเนส

แมนนาเนสพบได้ในจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งแบคทีเรีย รา ยีสต์ และแอคติโนมัยซีส [5] โดยส่วนใหญ่พบทั้งที่เป็นเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นได้เอง (constitutive enzyme) และเอนไซม์ที่ต้องมีการเหนี่ยวนำการผลิต (inducible enzyme) โดยแมนนาเนสส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ที่ผลิตแล้วหลั่งออกนอกเซลล์ (extracellular enzyme) ยกเว้นแมนนาเนสจาก *Sporocytophaga coccoids* และ *Aerobacter mannolyticus* ที่พบว่าเป็นเอนไซม์ที่ผลิตแล้วอยู่ในเซลล์ (intracellular enzyme) [13] ในปัจจุบันมีแมนนาเนสจากจุลินทรีย์หลายชนิดที่ถูกใช้ในทางการค้า เช่น *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp, *Caldibacillus cellulovorans, Caldicellulosiruptor* Rt8B, *Caldocellum saccharolyticum* [14-17] นอกจากนั้นในประเทศไทย Khampheng และคณะ (2006) ได้ทำการคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตแมนนาเนสจากดิน พบว่า *Bacillus circulans* NT6.7 สามารถผลิตแมนนาเนสได้สูงที่สุด โดยแสดงกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 0.306 หน่วยต่อมิลลิลิตร [18] ในขณะที่ Titapoka และคณะ (2008) สามารถคัดแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตแมนนาเนสจากดินได้ 2 ชนิด คือ *Klebsiella oxytoca* CW2-3 และ *Acinetobacter* sp. ST1-1 โดยแสดงกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะเท่ากับ 0.120 และ 0.185 หน่วมต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อใช้กากมะพร้าวเป็นสับสเตรตตามลำดับ [19] ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแหล่งของแมนนาเนสพบได้ในจุลินทรีย์หลายชนิดและกิจกรรมของเอนไซม์ก็จะแตกต่างกันตามแหล่งผลิตเอนไซม์อีกด้วย

5. การตรวจสอบจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตแมนนาเนส

การทดสอบในอาหารแข็งที่มีสับสเตรตของแมนนาเนส (gel-diffusion assay) เป็นวิธีการตรวจสอบและคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตแมนนาเนสที่ได้รับความนิยมมากที่สุด เนื่องจากเป็นวิธีการที่รวดเร็วและตรวจวัดผลได้ง่าย โดยตรวจสอบจากขนาดของวงใสรอบโคโลนีของจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้น วงใสที่เกิดรอบโคโลนีแสดงให้ทราบว่าโคโลนีนั้นๆ สามารถผลิตแมนนาเนสมาย่อยสับสเตรตเพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารในการเจริญเติบโตได้ อย่างไรก็ตามการตรวจสอบจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ด้วยวิธีการนี้ไม่เหมาะสมหรือยากต่อการคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตแมนนาเนสเนื่องจากอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราที่มีเส้นใยแผ่ขยายเต็มจานเพาะเชื้อรา และเกิดการแพร่กระจายของเอนไซม์ทำให้ยากต่อการวัดขนาดวงใสที่เกิดขึ้น

Downie และคณะ (1994) พัฒนาวิธีวิเคราะห์การทดสอบกิจกรรมของแมนนาเนสบนอาหารแข็ง พบว่าการวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์บนอาหารแข็งจะมีประสิทธิภาพสูงที่สุดภายใต้สภาวะที่เป็นกรดและเป็นกลาง และใช้สีคองโกเรด (Congo red) เป็นสีย้อม ซึ่งให้ผลที่ชัดเจนกว่าการใช้สี Remazol Brilliant Blue carob substrate [20] ซึ่งต่อมา Chang และคณะ (1992) และ De Nicolas-Santiago และคณะ (2006) พัฒนาการใช้แผ่นเมมเบรนโพลิคาร์บอเนตและเซลโลเฟน 400 (cellophane 400) ร่วมกับการใช้อาหารแข็งเพื่อใช้คัดแยกราที่ผลิตแมนนาเนส [21,22]

วิธีการใช้อาหารแข็งที่มีสับสเตรตของแมนนาเนสนอกจากเป็นวิธีที่ใช้คัดแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์แล้วยังสามารถใช้สำหรับหากิจกรรมของเอนไซม์ได้อีกด้วย โดยการเติมหรือหยด

สารละลายเอนไซม์ที่ต้องการทดสอบบนช่อง (well) ของอาหารแข็งที่มีสับสเตรตของเอนไซม์จากนั้นย้อมด้วยสีคองโกเรด สังเกตวงใสรอบช่องที่เกิดขึ้นบนอาหาร จากนั้นวัดเส้นผ่านศูนย์กลางที่เกิดขึ้นรอบวงใสแล้วคำนวณเป็นค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้โดยสร้างกราฟเปรียบเทียบระหว่างขนาดของวงใสที่เกิดขึ้นกับค่า log ของความเข้มข้นของเอนไซม์ [23]

6. การผลิตแมนนาเนส

แมนนาเนสจากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ที่ผลิตแล้วหลั่งออกนอกเซลล์ ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์คือองค์ประกอบของอาหารที่ใช้ผลิตเอนไซม์โดยเฉพาะอย่างยิ่งแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในอาหารที่ผลิตเอนไซม์ และสภาวะทางกายภาพ เช่น อุณหภูมิ พีเอช อัตราการกวน ปริมาณออกซิเจน [24]

อาหารที่ใช้ผลิตแมนนาเนสนิยมใช้แหล่งคาร์บอนจากสารประกอบแมนแนนต่างๆ เช่นโลคัสบีนกัม กัวกัม (guar gum) คอนยัคแมนแนน (konjac mannan) นอกจากนั้นสารประกอบแมนแนนต่างๆ ยังทำหน้าที่เป็นสารเหนี่ยวนำในการผลิตแมนนาเนสได้อีกด้วย [25] นอกจากแหล่งคาร์บอนที่มีส่วนสำคัญในการผลิตแมนนาเนสแล้วแหล่งไนโตรเจนก็มีความสำคัญเช่นกัน แหล่งไนโตรเจนในอาหารผลิตเอนไซม์แบ่งเป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน (organic nitrogen) เช่น สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) สารสกัดจากเนื้อ (beef extract) เปบโตน (peptone) และแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน (inorganic nitrogen) เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต โซเดียมไนเตรต ซึ่งจะเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดใดขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตเอนไซม์ นอกจากนั้น พบว่าแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนจะมีผลต่อการผลิตเอนไซม์แมนนเนสมากกว่าแหล่ง

ปัจจัยที่สำคัญต่อการผลิตแมนนาเนสอีกประการคืออิออนของโลหะหนักต่างๆ โดยพบว่าอิออนของโลหะหนักสามารถกระตุ้นหรือยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ เช่น แคลเซียมอิออน (Ca^{2+}) และแมกนีเซียมอิออน (Mg^{2+}) สามารถกระตุ้นการทำงานของแมนนาเนสจากเชื้อ *Clostridium* sp. ในขณะที่เฟอรัสอิออน (Fe^{3+}) อะลูมิเนียมอิออน (Al^{3+}) และเมอคิวรีอิออน (Hg^{2+}) ยับยั้งการทำงานของแมนนาเนส [27] นอกจากนั้นสภาพทางเคมีกายภาพ เช่น พีเอช อุณหภูมิ อัตราการกวน อัตราการให้อากาศ และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ก็เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตแมนนาเนสเช่นกัน

7. การผลิตแมนนาเนสโดยเทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ

เนื่องจากแมนนาเนสเป็นที่ต้องการอย่างมากในทางอุตสาหกรรม ดังนั้นการผลิตแมนนาเนสให้ได้ปริมาณมากจึงเป็นสิ่งจำเป็น การเหนี่ยวนำการผลิตแมนนาเนสโดยสายพันธุ์จุลินทรีย์ตามธรรมชาติจำเป็นต้องใช้สับเสตรทที่มีแมนแนนสูงในการเพาะเลี้ยง ซึ่งทำให้ต้นทุนสูงไปด้วยเพราะแมนแนนมีราคาแพงจึงไม่คุ้มค่าทางเศรษฐกิจ อีกทั้งยังต้องหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ซึ่งใช้เวลาและแรงงานมาก เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตรีคอมบิแนนท์แมนนาเนสซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย ใช้เวลาไม่นานและองค์ประกอบที่ใช้ในอาหารเพาะเลี้ยงมีราคาไม่แพง อีกทั้งยังได้เอนไซม์ในปริมาณมากขึ้นด้วย นอกจากนั้นการทำให้รีคอมบิแนนท์เอนไซม์บริสุทธิ์สามารถทำได้ง่าย ตัวอย่าง เช่น การต่อ tag ชนิดต่างๆ เข้าที่ด้านปลายของยีนแมนนาเนส เช่น His tag ซึ่งในบาง

กรณีจะช่วยให้การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์สำเร็จได้ในขั้นตอนเดียวด้วยวิธี immobilized metal affinity chromatography (IMAC) อันที่จริงแล้วมากกว่าครึ่งหนึ่งของเอนไซม์ที่ใช้กันมากทางอุตสาหกรรมล้วนผลิตมาจากเทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ [5, 28-31]

การผลิตรีคอมบิแนนท์แมนนาเนสทำได้โดยการโคลนยีนแมนนาเนสที่แยกได้จากสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ลงสู่เวกเตอร์เพื่อนำไปผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ในเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งที่นิยมใช้กันมากคือ *Escherichia coli* [32,33] และ *Pichia pastoris* [34, 35] แต่ถ้าเป็นยีนแมนมาเนสที่แยกได้จากรามักจะถูกนำไปแสดงออกในเซลล์เจ้าบ้านที่เป็นราเช่นกัน เช่น *P. pastoris* และ *Aspergillus* sp. [36,37] การใช้เทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอนอกจากจะทำให้สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมากแล้วยังทำให้ทราบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ควบคุมการสร้างแมนนาเนสซึ่งจะทำให้สามารถคาดการณ์โครงสร้างปฐมภูมิของเอนไซม์ และลำดับกรดอะมิโนที่สำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งนับเป็นก้าวสำคัญที่จะนำไปสู่การศึกษาโครงสร้างและสมบัติของแมนนาเนสจากแหล่งต่างๆ รวมถึงการปรับปรุงโครงสร้างของเอนไซม์ให้มีประสิทธิภาพในการทำงานสูงขึ้นได้โดยการทำมิวเทชัน (mutation) ที่ตำแหน่งต่างๆ บนยีน เช่น การสร้างแมนนาเนสที่มีเสถียรภาพสูงต่อการเปลี่ยนแปลง พีเอช และอุณหภูมิ [38,39] และจากรายงานที่ผ่านมาพบว่าขนาดของยีนแมนนาเนสจากสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ มีความหลากหลายมาก ซึ่งทำให้เห็นได้ว่าแมนนาเนสเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่คล้ายคลึงกันถึงแม้ว่าจะมีโครงสร้างปฐมภูมิต่างกันมาก [5,30,31]

ในบทความนี้จะขอยกตัวอย่างการโคลนและการแสดงออกของยีนแมนนาเนสที่มีสมบัติที่น่าสนใจดังนี้ การโคลนยีนแมนนาเนสจากรา *Bispora* sp. MEY-1 ลงใน *P. pastoris* พบว่ายีนนี้มีขนาด 1,347 คู่เบส เอนไซม์ทำงานได้ดีในสภาวะเป็นกรด (acidophilic) โดยพบว่ามีกิจกรรมสูงสุดที่พีเอชในช่วง 1.0-1.5 ซึ่งจัดว่าเป็นเป็นแมนนาเนสที่สามารถทำงานได้ที่พีเอชต่ำที่สุดเท่าที่มีรายงานมา และมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานสูงถึง 65 องศาเซลเซียส [38]

แมนนาเนสที่ทำงานได้ดีในสภาวะด่าง (alkaline mannanase) จะมีประโยชน์อย่างมากต่ออุตสาหกรรมผลิตเยื่อกระดาษและอุตสาหกรรมผลิตผงซักฟอก ซึ่งล้วนเป็นอุตสาหกรรมที่กระบวนการผลิตมีสภาวะเป็นด่างสูง ตัวอย่างจากการศึกษาของ He และคณะ (2008) พบว่าแมนนาเนสจาก *Bacillus* sp. N16-5 ที่ผลิตใน *P. pastoris* มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานที่พีเอชสูงถึง 10.0 และที่อุณหภูมิสูงถึง 70 องศาเซลเซียส และยังพบอีกว่ารีคอมบิแนนท์แมนนาเนสชนิดนี้มีเสถียรภาพสูงที่พีเอชและอุณภูมิสูง (pH stability and thermal stability) กว่าแมนนาเนสที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. N 16-5 ตามธรรมชาติอย่างเห็นได้ชัด นอกจากนั้นการปรับเปลี่ยนโปรโมเตอร์ให้เหมาะสมต่อการแสดงออกของยีนแมนนาเนสชนิดนี้ใน *P. pastoris* จะสามารถกระตุ้นการผลิตแมนนาเนสให้ได้ปริมาณมากขึ้นด้วย [38] ต่อมา Zhao และคณะ (2011) ได้ศึกษาโครงสร้างคริสตัลของแมนนาเนสจากเชื้อ *Bacillus* sp. N 16-5 รวมถึงการทำมิวเทชั่นที่ยีนแมนนาเนส ทำให้เกิดความเข้าใจที่ลึกซึ้งว่ากรดอะมิโนที่สำคัญต่อสมบัติการทนด่างของแมนนาเนสชนิดนี้คือกลูตามีนที่ตำแหน่ง 91 (Gln91) และ กลูตาเมทตำแหน่งที่ 226 (Glu226) [39]

นอกจากนั้น Bien-Cuong และคณะ (2009) ได้โคลนยีนแมนนาเนสจาก *A. niger* BK01 พบว่ามีขนาด 1,035 คู่เบส และนำไปแสดงออกใน *P. pastoris* รีคอมบิแนนท์แมนนาเนสที่ผลิตได้มีเสถียรภาพที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นานถึง 56 ชั่วโมง [40] ในขณะที่ Wang และคณะ (2010) โคลนยีนแมนนาเนสจาก *Pantoea agglomerans* ขนาด 1,047 คู่เบส และนำไปแสดงออกใน *E. coli* พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์แมนนาเนสชนิดนี้อยู่ที่พีเอช 6.0 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และมีเสถียรภาพในพีเอชช่วงกว้างตั้งแต่ 4.0 ถึง 10.0 [41]

จากตัวอย่างที่ยกมาข้างต้นทำให้เห็นได้ว่าเทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอมีประโยชน์อย่างมหาศาลต่อการพัฒนากระบวนการผลิตแมนนาเนสเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรมได้อย่างกว้างขวางและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

8. การประยุกต์แมนนาเนส

เอนไซม์หลักที่ใช้ในระดับอุตสาหกรรมเป็นเอนไซม์ในกลุ่มโปรติเอสและไกลโคไซด์ไฮโดรเลส (glycoside hydrolase) โดยสามารถจัดแบ่งประเภทอุตสาหกรรมได้เป็น 3 ส่วนใหญ่ คือ เอนไซม์ที่ใช้เพื่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์ เอนไซม์ในอาหาร และเอนไซม์ในอาหารสัตว์ ซึ่งปัจจุบันมีการนำแมนนาเนสไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ อย่างกว้างขวาง

อุตสาหกรรมการผลิตเยื่อกระดาษ แมนนาเนสเป็นเอนไซม์ที่ถูกนำมาใช้เพื่อช่วยในส่วนของการฟอกสีเยื่อกระดาษเพื่อลดการใช้สารเคมี และไม่เกิดการสูญเสียเยื่อกระดาษ ทั้งนี้เนื่องจากความจำเพาะของเอนไซม์ที่จะย่อยเฉพาะส่วนที่เป็นแมนเนนเท่านั้น เช่น แมนนาเนสจาก *Phanerochaete chrysosporium* สามารถนำไปใช้ในกระบวนการเตรียมเยื่อกระดาษจากไม้เนื้ออ่อนได้โดยลดการสูญเสียเยื่อกระดาษได้อย่างมีประสิทธิภาพ [42] อย่างไรก็ตามการใช้เอนไซม์ในอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อกระดาษนิยมใช้เอนไซม์หลายชนิดร่วมกันเช่นใช้เอนไซม์ไซลาเนสร่วมกับแมนนาเนส [7]

อุตสาหกรรมการผลิตกาแฟ ในกระบวนการสกัดเมล็ดกาแฟเพื่อใช้เป็นกาแฟผงสำเร็จ มีการนำแมนนาเนสไปใช้เพื่อกำจัดส่วนที่เป็นกาแลคโตแมนแนนในเมล็ดกาแฟเพื่อลดความหนืด และป้องกันการเกิดเจลในกระบวนการผลิตกาแฟผง [43] นอกจากนั้นยังสามารถใช้แมนนาเนสเพื่อลดความขุ่นในน้ำผลไม้ได้อีกด้วย

อุตสาหกรรมการซักล้าง ในปัจจุบันมีการใช้เอนไซม์โปรติเอส อะไมเลส ไลเปส และเซลลูเลสกันอย่างแพร่หลาย อย่างไรก็ตามมีการนำแมนนาเนสมาใช้ร่วมด้วยเพื่อช่วยเป็นสารเพิ่มความคงตัวให้กับผงซักฟอกและน้ำยาปรับผ้านุ่ม และใช้แมนนาเนสเพื่อช่วยกำจัดสารพวกเจลหรือเมือกต่างๆ ที่อาจติดมากับเสื้อผ้าได้ [44]

นอกจากนั้นปัจจุบันมีการนำแมนนาเนสมาใช้เพื่อเพิ่มมูลค่าวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น กากมะพร้าว กากอ้อย ฟางข้าว ให้มีมูลค่าเพิ่มมากขึ้น โดยการนำแมนนาเนสมาทำการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่างๆ เพื่อให้ได้น้ำตาลเป็นผลิตภัณฑ์ และใช้น้ำตาลดังกล่าวเป็นสารตั้งต้นในการผลิตไบโอเอธานอล [31,45] หรือใช้แมนนาเนสในการผลิตสารแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ซึ่งมีสมบัติความเป็นสารพรีไบโอติกเพื่อใช้เป็นสารเสริมในอาหารสัตว์ได้อีกด้วย [1]

9. บทสรุป

การประยุกต์แมนนาเนสในทางอุตสาหกรรมมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น การผลิตเยื่อกระดาษ การผลิตกาแฟ การผลิตสารซักฟอก การผลิตไบโอเอทานอล และการใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากแมนนาเนสเป็นสารเสริมในอาหารสัตว์ ซึ่งกระบวนการผลิตแมนนาเนสจำเป็นต้องคำนึงถึงหลายปัจจัย เช่น องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ สภาวะที่ใช้ในการผลิต และต้นทุนการผลิต อย่างไรก็ตามในปัจจุบันเทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอได้เข้ามามีบทบาทสำคัญในการพัฒนากระบวนการผลิตแมนนาเนสจากจุลินทรีย์ อีกทั้งยังสามารถนำไปสู่การปรับปรุงสมบัติการทำงานของแมนนาเนสให้มีประสิทธิภาพและมีความเหมาะสมต่ออุตสาหกรรมในวงกว้างโดยการเปลี่ยนแปลงที่โครงสร้างของแมนนาเนสอีกด้วย

10. เอกสารอ้างอิง

[1] ChemGen corporation, ChemGen, Available source: http://www.chemgen.com, February 20, 2012.

[2] Bhat, M.K., 2000, Cellulases and Related Enzyme in Biotechnology, Biotechnol. Adv. 18: 355-383.

[3] Karmakar, M. and Ray, R.R., 2011, Current trends in research and application of microbial cellulases, Res. J. Microbiol. 6: 41-53.

[4] Zyl, W.H., Rose, S.H., Trollope, K. and Gorgens, J.F., 2010, Fungal β-mannanases: Mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnological applications, Proc. Biochem. 45: 1203-1213.

[5] Dhawan, S. and Kaur, J., 2007, Microbial nannanases: An overview of production and applications, Crit. Rev. Biotechnol. 27: 197-216.

[6] Gubitz, G.M., Lischnig, T., Stebbing, D. and Saddler, J.N., 1997, Enzymatic removal of hemicelluloses from dissolving pulps, Biotechnol. Lett. 19: 491-495.

[7] Moreira, L.R.S. and Filho, E.X.F., 2008, An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems, Appl. Microbiol. Biotechnol. 79: 165-178.

[8] Yamasaki, T., Miyazaki, Y. and Kamei, Y., 1998, Isolation of bacteria that decompose major polysaccharides in the cell wall of the marine red alga *Porphyra yezoensis* and their application for protoplast production, Can. J. Microbiol. 44: 789-794.

[9] McCleary, B.V., 1979, Modes of action of β-mannanase enzymes of diverse origin on legume seed galactomannans, Phytochem. 18: 757-763.

[10] Stoll, D., LeNours, J., Anderson, L., Stalbrand, H. and Loleggio, L., 2005, The structure and characterization of a modular endo-β-1,4-mannanase from *Cellulomonas fimi*, Biochemistry 44: 12700-12708.

[11] Tenkanen, M., 1998, Action of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus oryzae* esterases in the deacetylation of hemicelluloses, Biotechnol. Appl. Biochem. 27: 19-24.

[12] Schroder, R., Wegrzyn, T.F., Bolitho, K.M. and Redgwell, R.J., 2004, Mannan transglycolase: A novel enzyme activity in cell walls of higher plants, Planta 219: 590-600.

[13] Dekker, R.F.H. and Richards, G.N., 1976, Hemicelluases: Their occurrence, purification, properties and mode of actions, Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 32: 277-352.

[14] Zhang, Q., Yan, X., Zhang, L. and Tang, W., 2006, Cloning, sequence analysis, and heterologous expression of a β-mannanase gene from *Bacillus subtilis* Z-2, Mol. Biol. 40: 368-374.

[15] Hatada, Y., Takeda, N., Hirasawa, K., Ohta, Y., Usami, R., Yoshida, Y., Ito, S. and Horikoshi, K., 2005, Sequence of the gene for a hhigh-alkaline mannanase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. strain JAMB-750, its expression in *B. subtilis* and characterization of the recombinant enzyme, Extremophiles 9: 497-500.

[16] Morris, D.D., Reeves, R.A., Gibbs, M.D., Saul, D.J. and Bergquist, P., 1995, Correction of the β-mannanase domain of the *celC* pseudogene from *Caldocellulosiruptor saccharolyticus* and activity of the gene product on kraft pulp, Appl. Environ. Microbiol. 61: 2262-2269.

[17] Sunna, A., Gibbs, M., Chin, C.W., Nelson, J. and Bergquist, P.J., 2000, A gene encoding a novel multidomain β-1,4-mannanase from *Caldibacillus cellulovorans* and action of the recombinant enzyme on kraft pulp, Appl. Environ. Microbiol. 66: 664-670.

[18] Khampheng, P., Nitisinprasert, S. and Keawsompong, S., 2006, Isolation, screening and identification of mannanase producing microorganisms, Kasetsart J. (Nat. Sci.) 40: 26- 38.

[19] Titapoka, S., Keawsompong, S., Haltrich, D. and Nitisinprasert, S., 2008, Selection and characterization of mannanase-roducing bacteria useful for the formation of prebiotic manno-oligosaccharides from copra meal, World J. Microbiol. Biotechnol. 24:1425-1433.

[20] Downie, B., Hilhorst, W.M. and Bewley, J.D., 1994, A new assay for quantifying endo-β-mannanase activity using congo red dye, Phytochemistry 36: 829-835.

[21] Chang, T.T., Yang, X.Y. and Ko, W.H., 1992, A sensitive method for detecting production of extracellular enzymes by fungi on solid media, Mycologia 84: 923-925.

[22] De-Nicola´s-Santiago, S., Regalado-Gonza´lez, C., Garc´ıa-Almenda´rez, B., Ferna´ndez, F.J., Te´llez-Jurado, A. and Huerta-Ochoa, S., 2006, Physiological, morphological, and mannanase production studies on *Aspergillus niger* uam-gs1 Mutants, Electron. J. Biotechnol. 9 Epub, Jan, 2006.

[23] Dingle, J., Reid, W.W. and Solamons, G.L., 1953, The enzymatic degradation of pectin and other polysaccahrides II, application of the "cup plate" assay to the estimation of enzymes, J. Sci. Food Agriculture. 4: 149.

[24] Lin, S.S., Dou, W.F., Xu, H., Li, H.Z., Xu, Z. H. and Ma, Y., 2007, Optimization of medium composition for the production of alkaline β-mannanase by alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5 using response surface methodology, Appl. Microbiol. Biotechnol. 75: 1015-1022.

[25] Yague, E., Mehak-Zunic, M., Morgan, L., Wood, D.A. and Thurston, C.F., 1997, Expression of CEL2 and CEL4, two proteins from *Agaricus bisporus* with similarity to fungal cellobiohydrolase I and β-mannanase, respectively, is regulated by carbon source, Microbiology 143: 239-244.

[26] Araujo, A. and Ward, O.P.,1990, hemicellulases of *Bacillus* species: Preliminary comparative studies on production and properties of mannanases and galactases, J. Appl. Bacteriol. 68: 253-261.

[27] Sun, Y. and Cheng, J., 2002, Hydrolysis of lignocellulosic material from ethanol production: A review, Biores. Technol. 83: 1-11.

[28] Luo, H., Wang, Y., Wang, Yang, J., Yang, Y., Huang, H., Yang, P., Bai, Y., Shi, P., Fan, Y. and Yao, B., 2009, A novel highly acidic β-mannanase from the acidophilic fungus *Bispora* sp. MEY-1: Gene cloning and overexpression in *Pichia pastoris*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 82: 453-461.

[29] Kote, N.V., Patil, A.G.G. and Mulimani, V. H., 2009, Optimization of the production of thermostable endo-β-1,4 mannanase from a newly isolated *Aspergillus niger gr* and *Aspergillus flavus* gr, Appl. Biochem. Biotechnol. 152: 213-223.

[30] Yamabhai, M., Buranabanyat, B., Jaruseranee, N. and Songsiriritthigul, C., 2011, Efficient *Escherichia coli* expression systems for the production of recombinant β-mannanases and other bacterial extracellular enzymes, Bioeng. Bugs. 2: 45-49.

[31] Chauhan, P.S., Puri, N., Sharma, P. and Gupta, N., 2012, Mannanase: Microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications, Appl. Microbiol. Biotechnol. 93: 1817-1830.

[32] Yang, P., Li, Y., Wang, Y., Meng, K., Luo, H., Yuan, Y., Bai, Y., Zhan, Z. and Yao, B., 2009, A novel β-mannanase with high specific activity from *Bacillus circulans* CGMCC1554: Gene cloning, expression and enzymatic characterization, Appl. Biochem. Biotechnol. 159: 85-94.

[33] Kim, D.Y., Ham, S.J., Lee, H.J., Cho, H.Y., Kim, J.H., Kim, Y.J., Shin, D.H., Rhee,Y.H., Son, K.H. and Park, H.Y., 2011, Cloning and characterization of a modular GH5 β-1,4-mannanase with high specific activity from the fibrolytic bacterium *Cellulosimicrobium* sp. strain HY-13, Biores. Technol. 102: 9185-9192.

[34] Duruksu, G., Ozturk, B., Biely, P. and Ogel, Z.B., 2009, Cloning, expression and characterization of endo-β-1,4-mannanase from *Aspergillus fumigatus* in *Aspergillus sojae* and *Pichia pastoris*, Biotechnol. Prog. 25: 271-276.

[35] Qiao, J., Rao, Z., Dong, B. and Cao, Y., 2010, Expression of *Bacillus subtilis* MA-139 beta-mannanase in *Pichia pastoris* and the enzyme characterization, Appl. Biochem. Biotechnol. 160: 1362-1370.

[36] Petrus, J., Zyl, V., Moodely, V., Rose, S.H., Roth, R.L. and Zyl, W.H.V., 2009, Production of the *Aspergillus aculeatus* endo-1,4-β-mannanase in *A. niger*, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 36: 611-617.

[37] Cai, H., Shi, P., Luo, H., Bai, Y., Huang, H., Yang, P. and Yao, B., 2011, Acidic β-mannanase from *Penicillium pinophilum* C1: Cloning, characterization and assessment of its potential for animal feed application, J. Biosci. Bioeng. 112: 551-557.

[38] He, X., Liu, N. Zhang, Z., Zhang, B. and Ma, Y., 2008, Inducible and constitutive expression of a novel thermostable alkaline β-mannanase from alkalophilic *Bacillus* sp. N16-5 in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme, Enz. Microb. Technol. 43: 13-18.

[39] Zhao, Y., Zhang, Y., Cao, Y., Qi, J., Mao, L., Xue, Y., Gao, F., Peng, H., Wang, X., Gao, G.F. and Ma, Y., 2011, Structural analysis of alkaline β-annanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5: Implications for adaptation to alkaline conditions, PLoS ONE 6(1): e14608.

[40] Bien-Cuong, D., Thi-Thu, D., Berrin, J.G., Haltrich, D., Kim-Anh, T., Sigoillot, J.C. and Yamabhai, M., 2009, Cloning, expression in *Pichia pastoris*, and Characterization of a thermostable GH5 mannan endo-1,4-beta-mannosidase from *Aspergillus niger* BK01, Microb. Cell Fact. 8(1): 59.

[41] Wang, J., Shao, Z., Hong, Y., Li, C., Fu, X. and Liu, Z., 2010, A novel β-mannanase from *Pantoea agglomerans* A021: Gene cloning, expression, purification and characterization, World J. Microbiol. Biotechnol. 26: 1777-1784.

[42] Benech, R.O., Li, X., Patton, D., Powlowski, J., Storms, R., Bourbonnais, R., Paice, M. and Tsang, A., 2007, Recombinant expression, characterization, and pulp prebleaching property of a *Phanerochaete chrysosporium* endo-β-1,4-mannanase, Enz. Microb. Technol. 41: 740-747.

[43] Sachslehner, A., Foidl, G., Foidl, N., Gubitz, G. and Haltrich, D., 2000, Hydrolysis of isolated coffee mannan and coffee extract by mannanases of *Sclerotium rolfsii*, J. Biotechnol. 80: 127-134.

[44] Kirk, O., Borchet, T.V. and Fuglsang, C.C., 2002, Industrial enzyme applications, Curr. Opin. Biotechnol. 13: 345-351.

[45] Howard, R.L, Abotsi, E., van Rensburg, E.L.J. and Howard, S., 2003, Lignocellulose biotechnology: Issues of bioconversion and enzyme production, Afr. J. Biotechnol. 2: 602-619.