



รายงานการวิจัย

การพัฒนาเอนไซม์เพื่อใช้ในการผลิตพรีไบโอติกจากกากมะพร้าว  
Improvement of enzyme for prebiotics production from copra

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

การพัฒนาเอนไซม์เพื่อใช้ในการผลิตพรีไบโอติกจากกากมะพร้าว  
Improvement of enzyme for prebiotics production from copra

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ เกษัชรหญิง ดร. มณฑารพ ยมาภัย

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชา เทคโนโลยีการเกษตร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ  
ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มิถุนายน ๒๕๕๓

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยความร่วมมือของนักวิจัยหลายท่านคือ นางสาวสุภาพ เอ็มรัตน์ นายบัญชา บุรณัฏญ์ศิริ ดร.ชมนุช สวัสดิ์ฤทธิกุล นายโค เปียน เค็ง รวมทั้งสมาชิกในห้องปฏิบัติการของข้าพเจ้าท่านอื่นๆ ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. คิณฐมา หาลทิช ผู้ให้คำปรึกษาในด้านการวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์ และคุณศุภกาญจน์ บุญอยู่ ที่ช่วยเหลือดูแลเรื่องการเงิน

ขอขอบคุณโครงการ AUNP (ASEAN University Network Project) และโครงการแลกเปลี่ยนบุคลากรกลุ่มน้ำโขง สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา ที่สนับสนุนการเดินทางแลกเปลี่ยนบุคลากรในการวิจัยครั้งนี้

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ ๒๕๔๘ - ๒๕๕๑

## บทคัดย่อ

ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการพัฒนาเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการใช้ผลิตพรีไบโอติกจากกากมะพร้าวเป็นอย่างดี โดยเอนไซม์ที่ได้พัฒนาขึ้นคือ เอนไซม์ มานานเนส ที่เตรียมได้จากจุลชีพ ๔ ชนิด คือ เชื้อรา แอสเพอร์จิลัส ไนเจอร์ บีเคโอวัน เชื้อแบคทีเรีย บาซิลลัส ไลเคนิฟอร์มิส ดีเอสเอ็ม ๘๖๘๕ และ ๑๓ และ บาซิลลัส สับซิลิส ๑๖๘ วิธีการที่ใช้ในการพัฒนาคือวิธีการทางพันธุวิศวกรรมที่เริ่มตั้งแต่การโคลนยีนขึ้นมาด้วยเทคโนโลยีพีซีอาร์ จากนั้นนำยีนที่ได้ไปแสดงออกเพื่อผลิตให้ได้จำนวนมากในระบบการแสดงออกที่เหมาะสม คือระบบการแสดงออกในแบคทีเรีย อี โคลไล และ ระบบการแสดงออกในยีสต์ พิเซีย พาสตอริส โดยผู้วิจัยสามารถพัฒนาระบบการแสดงออกที่เหมาะสม ทำให้สามารถผลิตเอนไซม์ออกมาได้เป็นจำนวนมาก และบริสุทธิ์ รวมทั้งยังมีประสิทธิภาพดีในการทำกิจกรรม จากนั้นได้ทำการวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์ด้วยวิธีการทางชีวสารสนเทศ และ ทางชีวเคมี รวมทั้งยังได้ทดสอบความสามารถในการย่อยแมนแนนจากแหล่งต่างๆ ผลจากการศึกษาพบว่าเอนไซม์มีคุณสมบัติที่เหมาะสมที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมด้านต่างๆ รวมทั้งการผลิตแมนแนนสายสั้นที่เป็นพรีไบโอติกจากกากมะพร้าวต่อไป ผลสำเร็จจากโครงการวิจัยนี้ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติ ๒ เรื่อง และ เป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโทและเอกของนักศึกษาอย่างละ ๑ เรื่อง รวมทั้งเอนไซม์ต้นแบบ และจุลชีพต่างๆ ที่สามารถนำไปต่อยอดเพื่อการวิจัยประยุกต์ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

We have successfully improved the enzymes that are suitable for the production of prebiotics from copra. The enzymes that have been improved in this research project came from four microorganisms namely, *Aspergillus niger* BK01, *Bacillus licheniformis* DSM 8785 and 13, and *Bacillus subtilis* 168. The methods that are used in this study were based on genetic engineering techniques starting from PCR cloning of mannase genes and over-expressing them in appropriate expression systems i.e. *E. coli* and *Pichia pastoris*. We were able to optimize the production of the enzymes such that a large amount of purified and active enzymes could be obtained. After that the enzyme properties were characterized by bioinformatics and biochemical methods. The results from enzyme analysis revealed that all enzymes are appropriate for industrial applications including bioconversion of copra mannan to prebiotics manno-oligosaccharide. The outcomes from this project have led to two publications in international journal and master and PhD thesis as well as improved enzymes and selected microorganism that can be the basis for future research in industrial-scale in the future.

## สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ .....	ก
บทคัดย่อ (ไทย และ อังกฤษ) .....	ข
สารบัญภาพ .....	3
บทที่ ๑ .....	4
๑.๑ ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย .....	4
๑.๒ วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	4
๑.๓ ขอบเขตของการวิจัย.....	5
๑.๔ ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย.....	5
๑.๕ หมายเหตุ .....	5
บทที่ ๒ .....	6
๒.๑ การทบทวนวรรณกรรม .....	6
๒.๑.๑ 프리ไบโอติก (Prebiotics) .....	6
๒.๑.๒ เอนไซม์ mannanase และ mannan จากกากมะพร้าว .....	9
๒.๒ วิธีการดำเนินการวิจัย.....	9
บทที่ ๓ .....	11
๓.๑ ผลการวิจัย เกี่ยวกับเอนไซม์ mannanase จากเชื้อ <i>Aspergillus niger</i> BK01 .....	11
๓.๒ ผลการวิจัย เกี่ยวกับเอนไซม์ mannanase จากเชื้อ <i>Bacillus licheniformis</i> .....	24
๓.๓ ผลการวิจัยอื่นๆ ที่ไม่ได้นำไปตีพิมพ์ .....	38
๓.๓.๑ ผลการวิจัยเกี่ยวกับเอนไซม์ mannanase จากเชื้อ <i>Bacillus subtilis</i> 168 .....	38
๓.๓.๒ ผลการวิจัยเกี่ยวกับการค้นหาเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ที่สามารถย่อย mannan ได้ .....	42
บทที่ ๔ .....	56
๔.๑ สรุปผลการวิจัยทั้งหมด.....	56
๔.๒ ข้อวิจารณ์.....	57

บรรณานุกรม .....	59
ภาคผนวก.....	61
ภาคผนวก ก: การเผยแพร่ผลงานวิจัย.....	61
๑. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ.....	61
๒. ผลงานนำเสนอในงานประชุมทางวิชาการต่างๆ .....	61
ภาคผนวก ข: รายการครุภัณฑ์.....	63
ภาคผนวก ค: ผลการวิเคราะห์ลำดับเส้น DNA ของยีน 16sRNA .....	64
ประวัตินักวิจัย.....	66

## สารบัญภาพ

ภาพแสดงตัวอย่างของฟรีไบโอดีคที่มีวางขายในท้องตลาด.....	8
โครงสร้างปฐมภูมิและทุติยภูมิของเอนไซม์ mannanase จากแบคทีเรียชนิดต่างๆ .....	38
แบบจำลองโครงสร้าง ๓ มิติของเอนไซม์ mannanase จาก <i>B. subtilis</i> 168 .....	39
ก) ภาพแสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำกิจกรรมของเอนไซม์ .....	39
ข) ความทนทานของเอนไซม์หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆเป็นเวลา ๓๐ นาที.....	40
ค) ภาพแสดงค่าความเป็นกรดค่าที่เหมาะสมในการทำกิจกรรมของเอนไซม์ .....	40
ง) ความทนทานของเอนไซม์หลังจากเก็บไว้ที่ความเป็นกรดค่าต่างๆ เป็นเวลา ๓๐ นาที .....	40
จ) ผลผลิตจากการย่อย Mannan ด้วยวิธีการ TLC .....	41
ฉ) ตารางความสามารถในการทำกิจกรรมของเอนไซม์เมื่อเทียบกับ mannanase จากเชื้อ <i>B. licheniformis</i> .....	41
ช) ตารางแสดงค่าทางพลจลศาสตร์ของเอนไซม์เมื่อเทียบกับ mannanase จากเชื้อ <i>B. licheniformis</i> .....	42
๓.๒.๒.๑ <i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i> .....	42
๓.๒.๒.๒ <i>Paenibacillus polymyxa</i> (1994) .....	43
๓.๒.๒.๓ <i>Chryseobacterium indologenes</i> (1994) .....	43

## บทที่ ๑ บทนำ

### ๑.๑ ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

พรีไบโอติก (prebiotics) คือ สารอาหารที่ไม่สามารถถูกย่อยได้ หรือถูกย่อยได้น้อยในทางเดินอาหารของคน และสัตว์ สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่เป็นมิตร (probiotics) เช่น แบคทีเรียในกลุ่ม lactobacilli และกลุ่ม bifidobacteria ที่อยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์ได้ [1-3] การอาศัยอยู่ของแบคทีเรียที่เป็นมิตรในลำไส้มีประโยชน์หลายประการกับสุขภาพของคนและสัตว์ ตั้งแต่ช่วยในการย่อยอาหารที่ระเพาะและลำไส้เล็ก ช่วยเพิ่มการดูดซึมสารอาหารและแร่ธาตุ การผลิตวิตามินในแก่งร่างกาย ลดระดับของ Cholesterol ช่วยคอยจับไล่แบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคชนิดต่างๆ ที่ปนเปื้อนมากับอาหาร ป้องกันการเกิดมะเร็ง รวมทั้งช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันของสัตว์ [4] และช่วยกำจัดสารพิษ เช่น สารไนเตรดและไนโตร โดยเปลี่ยนให้เป็นไนโตรเจน โดยสารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกนั้นได้แก่ ketose sugar หรือสายใยน้ำตาลโมเลกุลสั้น (oligosaccharides) เนื่องจากน้ำตาลโมเลกุลสั้นเหล่านี้เป็นสารที่ได้จากธรรมชาติ จึงไม่ทำให้เกิดอาการแพ้ หรือระคายเคือง และเป็นอันตรายต่อร่างกาย นอกจากนั้นแล้วยังทนต่อความร้อนและสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหาร ทำให้สะดวกต่อการจัดเก็บและขนส่ง โดยเฉพาะเมื่อเทียบกับการใช้จุลชีพพรีไบโอติก จากการประมาณการโดยบริษัท Frost & Sullivan พบว่า พรีไบโอติกนั้นมีศักยภาพทางการตลาดสูง โดยมีอัตราการเติบโตของตลาดพรีไบโอติกต่อปีคือร้อยละ ๕.๖ และได้คาดการณ์ว่ามูลค่าทางการตลาดของพรีไบโอติก จะสูงถึง ๑๗๕.๕ ล้านดอลลาร์ภายในปี ค.ศ. ๒๐๑๐

ในการผลิตพรีไบโอติกนั้นสามารถผลิตได้ ๓ แบบ คือ การสกัดจากพืช การผลิตจากจุลชีพหรือใช้เอนไซม์ในการสังเคราะห์ และจากการใช้เอนไซม์ย่อยสายใยน้ำตาลโมเลกุลยาว (polysaccharide) [5] ซึ่งวัตถุดิบที่จะนำมาใช้ในการผลิตเป็นพรีไบโอติกนั้นสามารถหาได้ง่ายและราคาถูก โดยในปัจจุบันกากของเหลือที่สำคัญที่จะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตสายใยน้ำตาลก็คือของเหลือจากการผลิตชีสและผลิตภัณฑ์จากนมอื่นๆ ที่มีน้ำตาล lactose เป็นองค์ประกอบ ส่วนในประเทศไทย กากของเหลือที่น่าสนใจที่จะมาทำเป็นวัตถุดิบในการผลิตพรีไบโอติก คือ กากมะพร้าว เพราะในกากมะพร้าวมีองค์ประกอบประเภทสารคาร์โบไฮเดรตประเภทประมาณ 48%, ลิกนิน 5%, โปรตีน 21% และไขมันเกือบ 10% ซึ่งพบว่าคาร์โบไฮเดรตในมะพร้าวนั้นเป็น mannan และอนุพันธ์ของ mannan มากถึง 60-70 % ([www.chemgen.com/coprmeal.html](http://www.chemgen.com/coprmeal.html)) จึงสามารถนำมาย่อยสลายโดยเอนไซม์ mannanase ให้เป็นสายใยน้ำตาล manno-oligosaccharides (MOS) ได้ จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าสายใยน้ำตาลชนิดนี้สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่เป็นมิตรของคนและสัตว์ได้หลายประเภท โดยวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยนี้ คือ การผลิตเอนไซม์ mannanase ด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเพื่อทำการผลิตเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพดีในการย่อยสลายกากมะพร้าวซึ่งเป็นของเหลือใช้ให้เป็นสายใยน้ำตาลที่เป็นประโยชน์ต่อสัตว์และคนต่อไป ซึ่งถ้าสามารถทำการผลิตได้สำเร็จก็จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อประเทศ เพราะปัจจุบันยังไม่มีสายใยน้ำตาลประเภท manno-oligosaccharide จากกากมะพร้าววางขายในท้องตลาด ดังนั้นผลงานจากโครงการวิจัยนี้จะเป็นการสร้างผลิตภัณฑ์ใหม่ ซึ่งเป็นการช่วยสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับกากมะพร้าวซึ่งเป็นของเหลือทางการเกษตรที่สำคัญของประเทศ โดยการใช้เทคโนโลยีเอนไซม์เป็นเทคโนโลยีหลักในการผลิตพรีไบโอติกประเภท manno-oligosaccharide (MOS) นั้นเป็นเพราะเทคโนโลยีเอนไซม์เป็นเทคโนโลยีที่สำคัญในการพัฒนาอุตสาหกรรมแบบยั่งยืน (sustainable environment) เนื่องจากเป็นเทคโนโลยีที่ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อสิ่งแวดล้อม

### ๑.๒ วัตถุประสงค์ของการวิจัย



เพื่อทำการพัฒนาเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการผลิตสาร manno-oligosaccharide (MOS) ที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกจากกากมะพร้าว โดยแบ่งเป็นหัวข้อย่อยได้ดังนี้

๑.๒.๑ เพื่อคัดหาจุลินทรีย์จากแหล่งต่างๆ ที่สามารถผลิตเอนไซม์ mannanase ได้ดี

๑.๒.๒ เพื่อทำการสกัดแยกยีนที่สร้างเอนไซม์ mannanase จากจุลินทรีย์ที่ได้คัดหามา และโคลนเข้าไว้ในพลาสมิดที่เหมาะสม

๑.๒.๓ เพื่อทำการพัฒนาระบบการผลิตเอนไซม์ mannanase ที่เหมาะสม เพื่อให้ได้เอนไซม์ที่มีคุณสมบัติที่เหมาะสมแก่การปรับใช้ในการผลิตพรีไบโอติกในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

๑.๒.๔ เพื่อศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เบื้องต้น เพื่อประเมินความเหมาะสมในการนำเอนไซม์ที่ได้พัฒนาขึ้นไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

### ๑.๓ ขอบเขตของการวิจัย

เริ่มต้นจากการคัดหาจุลินทรีย์จากแหล่งต่างๆ ที่สามารถผลิตเอนไซม์ mannanase ได้ดี หลังจากนั้นจะทำการสกัดแยกยีนที่สร้างเอนไซม์ mannanase จากแบคทีเรีย หรือราที่ได้คัดหามาได้ แล้วนำไปโคลนไว้ในพลาสมิดที่เหมาะสม หลังจากนั้นจะทำการพัฒนาระบบการผลิตเอนไซม์ mannanase ในแบคทีเรีย *Escherichia coli* หรือยีสต์ *Pichia pastoris* เพื่อให้ได้เอนไซม์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมแก่การปรับใช้ในการผลิตพรีไบโอติกในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

### ๑.๔ ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

๑.๔.๑ จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ mannanase ที่ดี

๑.๔.๒ ยีนของเอนไซม์ mannanase

๑.๔.๓ ระบบการผลิตเอนไซม์ mannanase ที่ดี

๑.๔.๔ เอนไซม์ mannanase ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการผลิตพรีไบโอติก MOS

๑.๔.๕ ผลงานตีพิมพ์ทางวิชาการระดับนานาชาติ

๑.๔.๕ วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท และเอกของนักศึกษา

### ๑.๕ หมายเหตุ

ในการรายงานวิจัยนี้ ในส่วนที่เป็นรายละเอียดความรู้วิทยาศาสตร์เชิงลึก จะทำการรายงานเป็นภาษาอังกฤษในรูปแบบผลงานตีพิมพ์ทางวิชาการจริงๆ เพราะเป็นบทความที่ได้ผ่านการคัดกรองโดยผู้ทรงคุณวุฒิมาอย่างดีแล้ว หากต้องนำมาแปลเป็นภาษาไทยเพียงเพื่อเขียนเป็นรายงานฉบับสมบูรณ์นี้ จะเกิดความเย็นเยื่อ ไม่คุ้มกับเวลาที่จะต้องเสียไป และไม่น่าจะมีประโยชน์ต่อวงวิชาการ และการวิจัยของประเทศไทยนัก

## บทที่ ๒ พื้นฐานงานวิจัย

### ๒.๑ การทบทวนวรรณกรรม

#### ๒.๑.๑ *พรีไบโอติก (Prebiotics)*

ในปัจจุบัน มนุษย์ได้ตระหนักถึงการมีสุขภาพดีกันมากขึ้น ดังจะเห็นได้จากการให้ความสำคัญในการออกกำลังกายที่มากขึ้น การเลือกบริโภคอาหารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ การรณรงค์งดการสูบบุหรี่ รวมทั้งความนิยมในการบริโภคผลิตภัณฑ์ประเภทอาหารเสริมที่ผลิตจากธรรมชาติ หรือการใช้เกษตรอินทรีย์นั้นก็กำลังได้รับความสนใจอย่างสูง และจะยังเพิ่มขึ้นอีกเรื่อยๆ [6] โดยเฉพาะในประเทศแถบตะวันตก ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมจากธรรมชาติที่กำลังได้รับความสนใจและนิยมเป็นอันมากประเภทหนึ่งคือ การเสริมโพรไบโอติก (probiotics) [7] ซึ่งเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่เป็นมิตรกับคนและสัตว์ในทางเดินอาหาร แบคทีเรียเหล่านี้อาศัยอยู่เป็นจำนวนมากในลำไส้ใหญ่ของทั้งคนและสัตว์ พบได้บ้างในลำไส้เล็กและกระเพาะอาหาร โดยแบคทีเรียที่เป็นมิตรเหล่านี้ แบ่งออกเป็น ๒ กลุ่มใหญ่ๆ [8] คือ กลุ่ม lactobacilli และกลุ่ม bifidobacteria แบคทีเรียในกลุ่ม lactobacilli นั้นจัดอยู่ในกลุ่ม facultative anaerobe คือ กลุ่มจุลินทรีย์ที่ดำรงชีวิตอยู่ได้ทั้งในภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน ส่วนแบคทีเรียในกลุ่ม bifidobacteria นั้นถูกจัดอยู่ในกลุ่ม anaerobe คือ เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการดำรงชีวิต ซึ่งสภาวะภายในลำไส้ใหญ่ที่มีออกซิเจนต่ำนั้น มีความเหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นมิตรทั้ง ๒ ชนิดนี้เป็นอย่างดี โดยแบคทีเรียเหล่านี้จะมีชีวิตอยู่ได้จากการย่อยสลายกากอาหารที่ร่างกายของคนและสัตว์ไม่สามารถย่อยสลายหรือดูดซึมได้ รวมทั้งของเสียหรือสารพิษอื่นๆ ที่เกิดขึ้นภายในลำไส้ของสัตว์ด้วย การอาศัยอยู่ของแบคทีเรียที่เป็นมิตรในลำไส้เช่นนี้ มีประโยชน์หลายด้านกับสุขภาพของคนและสัตว์ ตั้งแต่ช่วยในการย่อยอาหารที่กระเพาะและลำไส้เล็กให้สามารถย่อยได้ ช่วยในการดูดซึมแร่ธาตุ รวมทั้งแบคทีเรียหลายชนิดยังสามารถผลิตวิตามินที่สามารถถูกดูดซึมผ่านผนังลำไส้ใหญ่เข้าไปใช้ในร่างกายได้ด้วย นอกจากนั้นแล้ว บทบาทที่สำคัญอีกประการหนึ่งของแบคทีเรียที่เป็นมิตรเหล่านี้ก็คือ คอยขับไล่แบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคต่อร่างกายที่ปนเปื้อนมากับอาหารที่รับประทานเข้าไป นอกจากนั้นแล้วยังมีรายงานทางวิทยาศาสตร์ที่แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียที่เป็นมิตรเหล่านี้ สามารถช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันของสัตว์ และช่วยกำจัดสารพิษเช่น สารไนเตรตและไนโตร โดยเปลี่ยนให้เป็นไนโตรเจนได้อีกด้วย [9]

ด้วยประโยชน์เป็นอันมากของแบคทีเรียที่เป็นมิตรเช่นนี้ จึงได้มีการผสมจุลินทรีย์ทั้ง 2 ประเภท คือ lactobacilli และ bifidobacteria เพื่อทำเป็นเครื่องเสริมสุขภาพหลายประเภท โดยผลิตภัณฑ์ที่เป็นที่รู้จักกันดีก็คือ นมเปรี้ยวชนิดต่างๆ ซึ่งมีแบคทีเรียประเภท lactobacilli อยู่ โดยรสเปรี้ยวที่เกิดขึ้นนั้นมาจากกรดแลคติกที่แบคทีเรียเหล่านี้ผลิตขึ้นจากการย่อยสลายน้ำตาลแลคโตสในนม นอกจากนั้นแล้วยังมีการเติมจุลินทรีย์โพรไบโอติกเข้าไปในอาหารสัตว์ด้วย เมื่อคนและสัตว์บริโภคอาหารที่มีจุลินทรีย์เหล่านี้เข้าไป จุลินทรีย์เหล่านี้ก็จะไปเจริญและเพิ่มจำนวนในลำไส้ใหญ่ของคนและสัตว์ แล้วช่วยในการย่อยสลายและดูดซับสารอาหาร รวมทั้งคอยช่วยป้องกันแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค ซึ่งเป็นการช่วยส่งเสริมสุขภาพของทั้งคนและสัตว์

อย่างไรก็ตามข้อจำกัดประการที่สำคัญของการใช้โพรไบโอติก ในการเป็นอาหารเสริมสุขภาพนั้นคือ โพรไบโอติกเป็นสิ่งมีชีวิต ดังนั้นการขนส่งและการจัดเก็บ ต้องทำด้วยความระมัดระวังเป็นพิเศษ เพื่อให้จุลินทรีย์ยังคงมีชีวิตอยู่ โดยเฉพาะในเขตประเทศเขตร้อน เช่นประเทศไทย ด้วยความยากลำบากและค่าใช้จ่ายที่ยังสูงอย่างนี้จึงทำให้การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกยังมีอยู่ในวงจำกัด

ทางเลือกอีกประการหนึ่งซึ่งเป็นแนวทางใหม่และกำลังได้รับความสนใจมากขึ้นในปัจจุบัน คือ การใช้พรีไบโอติก (prebiotics) [10] หรือสายใยน้ำตาลโมเลกุลสั้น (Oligosaccharide) มาช่วยกระตุ้นการเจริญของโพรไบโอติกที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์ ดังนั้น พรีไบโอติกจึงถือเป็นอาหารเสริมสุขภาพที่มีความสำคัญของทั้งคนและสัตว์ชนิดใหม่ ซึ่งสายใยน้ำตาลเหล่านี้สามารถพบได้ หรือสร้างได้จากวัตถุดิบจากธรรมชาติหลายประเภท โดยมีคุณสมบัติร่วมที่

สำคัญ คือ การไม่ถูกย่อยสลายหรือถูกย่อยได้เล็กน้อยในทางเดินอาหารของคนและสัตว์ จึงไม่สามารถถูกดูดซึมไปให้พลังงานแก่ร่างกาย แต่จะเคลื่อนที่ส่วนกระเพาะและลำไส้เล็กลงไปจนถึงลำไส้ใหญ่ ซึ่งจะกลายเป็นอาหารที่สำคัญของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ต่อไป ได้มีการศึกษาทดลองพบว่า ถ้าได้ใส่สาหร่ายน้ำตาลประเภทนี้ลงไปผสมกับอาหารสัตว์ในปริมาณจำกัด คือ ไม่เกิน 1% จะมีผลให้สัตว์มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นและมีสุขภาพโดยทั่วไปดีขึ้นด้วย [10] ตัวอย่างของสาหร่ายน้ำตาลเหล่านี้ พร้อมทั้งสูตรโครงสร้างแสดงดังภาพแสดงด้านล่าง

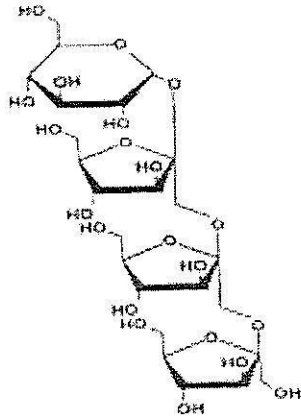
โดยในปัจจุบันมีสาหร่ายน้ำตาลหลายชนิดวางขายตามท้องตลาดแล้ว ตัวอย่างของน้ำตาลที่มีขายในท้องตลาดและวิธีการผลิต แสดงดังตารางที่ ๑ โดยคาดว่ากลไกหลักของการทำงานของสาหร่ายน้ำตาลเหล่านี้ ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตและส่งเสริมสุขภาพของคนและสัตว์ คือ

๑. เป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญ ให้กับเฉพาะแบคทีเรียที่เป็นมิตร โดยเฉพาะในกลุ่ม bifidobacteria แต่แบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคแก่ร่างกายไม่สามารถนำสาหร่ายน้ำตาลไปใช้ได้ ดังนั้นจึงสามารถใช้สาหร่ายน้ำตาลเหล่านี้ในการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียประจำถิ่นที่เป็นมิตรซึ่งมีอยู่แล้วภายในคนและสัตว์ เพื่อทดแทนการใส่แบคทีเรียจากภายนอกลงไปได้ จากการศึกษาพบว่า สาหร่ายน้ำตาล เช่น N-acetylglucosamine หรือ lactulose มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ bifidogenic factor หรือสารที่มีความสามารถกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์จำพวก bifidobacteria นอกจากนั้นแล้วยังมีการรายงานว่า สาหร่ายน้ำตาล fructo-oligosaccharide (FOS) สามารถช่วยเพิ่มจำนวนประชากร bifidobacteria ในลำไส้ใหญ่ของคนได้ด้วย (Maria et al, 2002) รวมทั้งสาหร่ายน้ำตาล gluco-oligosaccharide (GOS) จากนั้นนมแม่ก็สามารถเพิ่มปริมาณ bifidobacteria ในทารกได้เช่นกัน

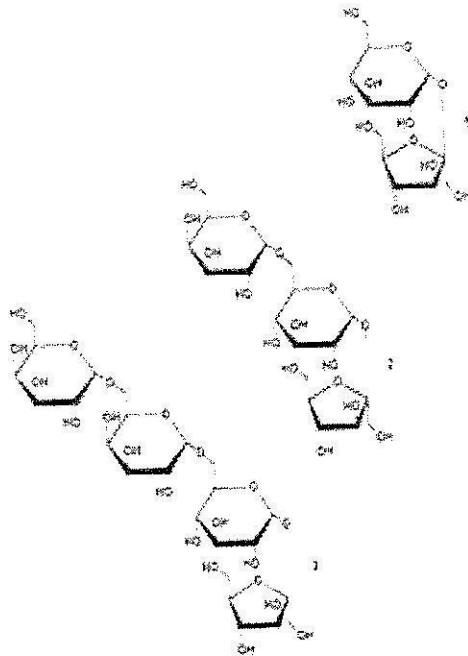
๒. สาหร่ายน้ำตาลบางประเภทสามารถกระตุ้นแบคทีเรียประจำถิ่นที่เป็นมิตรหลายชนิดในร่างกายให้ผลิตเอ็นไซม์เพิ่มมากขึ้น ซึ่งเอ็นไซม์เหล่านี้จะถูกนำไปใช้ช่วยย่อยอาหารต่างๆ ในร่างกายสัตว์ให้ได้เป็นสารอาหารที่สามารถดูดซึมเข้าไปใช้ในร่างกายได้

ตารางที่ ๑ ตัวอย่างของสาหร่ายน้ำตาลที่มีขายตามท้องตลาด

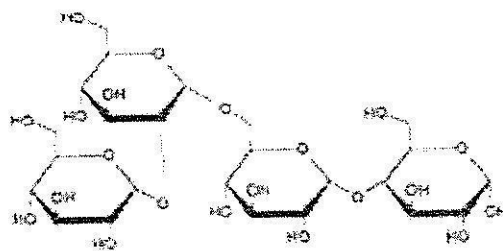
ผลิตภัณฑ์	วิธีการผลิต
$\beta$ -Fructo-oligosaccharides	a) Transfructosylation of sucrose) b) hydrolysis of inulin)
$\alpha$ -Galacto –oligosaccharides	Isolation from soybean whey
$\beta$ -Galacto –oligosaccharides	Transgalactosylation of lactose
Lactulos	Isomerisation of lactose
Isomalto-oligosaccharides	Transglucosylation of liquefied starch
Maltotetraose	Enzymatic hydrolysis of starch
Xylo-oligosaccharides	Enzymatic hydrolysis of xylans
Chito-oligosaccharides	Enzymatic hydrolysis of chitin



Fructo-oligosaccharides (FOS)



$\alpha$ -Gluco-oligosaccharides (GOS)



$\alpha$ -Galacto-oligosaccharides

ภาพแสดงตัวอย่างของพรีไบโอติกที่มีวางขายในท้องตลาด

๓. สายใยน้ำตาลเหล่านี้สามารถจับกับ receptor บนผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค ทำให้แบคทีเรียเหล่านี้ไม่สามารถเข้าไปทำร้ายร่างกายได้ โดยได้มีการค้นคว้าการใช้สายใย manno-oligosaccharides ในการลดการติดเชื้อ *Salmonella* ในลูกไก่มาแล้ว [10]

๔. นอกจากสายใยน้ำตาลจะสามารถจับกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคแล้วยังมีข้อสันนิษฐานว่าสายใยน้ำตาลบางประเภทจะสามารถจับกับผนังเยื่อเซลล์ในลำไส้ของคนและสัตว์ได้ ซึ่งในบางกรณีการจับกับเยื่อเซลล์ที่มีหน้าที่ในการสร้างภูมิคุ้มกันจะทำให้เกิดการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีออกมาเพื่อช่วยสร้างภูมิคุ้มกันให้กับคนและสัตว์ได้ โดยเมื่อไม่นานมานี้ได้มีการรายงานว่าการนำสายใยน้ำตาล lactulose ไปป้อนให้กับแม่สุกรพบว่า ช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของลูกสุกรได้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสายใยน้ำตาลนี้ไปช่วยสร้างภูมิคุ้มกันให้แก่แม่สุกร ซึ่งสามารถส่งต่อไปยังลูกได้

### ๒.๑.๒ เอนไซม์ mannanase และ mannan จากกากมะพร้าว

เอนไซม์ mannanase หรือ  $\beta$ -D-mannanase หรือ mannan endo-1,4-beta-mannosidase หรือชื่อตามระบบว่า 1,4- $\beta$ -D-mannan mannohydrolase (EC 3.2.1.78) [11, 12] เป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา hydrolysis แบบสุ่มของพันธะ  $\beta$ -1,4-mannosidic [13] ซึ่งเป็นพันธะหลักที่พบได้ในสายคาร์โบไฮเดรตประเภท mannan และ heteromannan โดย mannan นั้นเป็นสาร polysaccharide ที่พบบ่อยและเป็นจำนวนมากโดยเฉพาะในเมล็ด และผนังเซลล์ของพืช เช่น locus bean gum กากมะพร้าว เมล็ดกาแฟ และปาล์ม ซึ่ง mannan ที่พบอยู่ในกากมะพร้าวนั้น มีลักษณะเป็นสายยาวตรง จึงทำให้เหมาะสมที่จะนำมาย่อยให้ได้เป็น สายใยน้ำตาลโมเลกุลสั้นชนิด manno-oligosaccharide (MOS) โดยความสามารถในการย่อยสลาย mannan ให้ได้เป็น manno-oligosaccharide ที่มีความยาวต่างๆกันนั้น ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มา หรือคุณสมบัติของเอนไซม์  $\beta$ -mannanase และสถานะในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ เอนไซม์นี้สามารถพบได้ในแบคทีเรียและราหลายประเภท แต่ข้อมูลเกี่ยวกับ โครงสร้าง หน้าที่ และแหล่งที่มาของเอนไซม์ยังมีไม่มากนัก

### ๒.๒ วิธีการดำเนินการวิจัย

การดำเนินการวิจัยส่วนใหญ่ทำที่ห้องปฏิบัติการของหัวหน้าโครงการที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

#### ปีที่ ๑

##### ๑ การคัดหาแบคทีเรียหรือราจากแหล่งต่างๆที่สามารถผลิตเอนไซม์ mannanase ได้ดี

ทำการคัดเลือกแบคทีเรียหรือราจากแหล่งต่างๆ ที่เจริญบนกากมะพร้าว หรืออาหารหมักจากแหล่งธรรมชาติที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง โดยทำการคัดแยกเชื้อบนจานเลี้ยงเชื้อที่มี Locus bean gum และ mannan เป็นสารอินทรีย์หลัก โดยอ้างอิงจากวิธีการที่ได้รับการตีพิมพ์แล้วของ Abe Jun-ichi และคณะ ในปี 1994 [14] จากนั้นทำการตรวจสอบชนิดของแบคทีเรีย และรา ที่คัดหามาได้โดยวิธีการทางชีวเคมี และเทียบจากลำดับเบส ของ 16S หรือ 18S rRNA

##### ๒ การสกัดแยกยีนที่สร้างเอนไซม์ mannanase จากแบคทีเรียหรือราที่ได้คัดหามา และโคลนเข้าไปในพลาสมิดที่เหมาะสม

ทำการสกัดแยกยีนด้วยวิธี PCR หรือ RT-PCR โดยทำการออกแบบ primers เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนยีนจากข้อมูลของยีนโนมของแบคทีเรียหรือรา ที่มีอยู่แล้วในฐานข้อมูล Genbank

#### ปีที่ ๒

##### ๑ การพัฒนาระบบการผลิตเอนไซม์ mannanase เพื่อให้ได้เอนไซม์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมแก่การปรับใช้ในการผลิต prebiotics ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

นำยีนที่สกัดมาได้มาโคลนเข้าไปในเวกเตอร์เพื่อใช้ในการแสดงออกใน *Escherichia coli* หรือ *Pichia pastoris* ที่เหมาะสม ได้แก่ เวกเตอร์ pET และ pFLAG สำหรับ *E. coli* และ pPIC $\alpha$  สำหรับ *P. pastoris* โดยจะทำการตัดต่อยีนเข้าไปในเวกเตอร์เพื่อให้เอนไซม์สามารถถูกปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ เข้าบ้านที่ใช้ผลิตเอนไซม์ได้ รวมทั้งจะมี tag ที่จะใช้ในการสกัดแยกให้บริสุทธิ์ในกรณีที่ต้องการผลิตเป็นจำนวนมากตามแนวทางที่ได้มีการรายงานไว้ก่อนหน้านี้แล้ว [15] หลังจาก

นั้นจะทำการตรวจสอบความสามารถในการมีกิจกรรมของเอนไซม์ที่สภาวะต่างๆ รวมทั้งความสามารถในการย่อย mannan โดยการทดสอบบนจานเลี้ยงเชื้อและโดยวิธีการทางชีวเคมี โดยอ้างอิงวิธีการตรวจสอบจากรายงานอื่นที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว [16]

ปีที่๓

๑. ทำการศึกษาคณสมบัติของเอนไซม์ที่ได้ทำการพัฒนาขึ้นมา

ขั้นตอนนี้เป็นการวิเคราะห์คุณสมบัติต่างๆ ของเอนไซม์ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์แล้ว เพื่อประเมินความเหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรม ด้วยการใช้เทคโนโลยีชีวสารสนเทศ (bioinformatics) และวิธีการทางชีวเคมี อาทิเช่น น้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) ความสามารถในการแตกตัว (isoelectric point) ความเหมือนกับเอนไซม์อื่น (sequence alignment) ผลของอุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดต่อความสามารถในการทำกิจกรรม คุณสมบัติทางพลจลศาสตร์ (kinetics) รวมทั้งการตรวจสอบคุณสมบัติของผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลาย mannan มาตรฐาน ด้วยวิธีการ thin layer chromatography

บทที่ ๓  
ผลการวิจัย

๓.๑ ผลการวิจัย เกี่ยวกับเอนไซม์ mannanase จากเชื้อ *Aspergillus niger* BK01

รายงานผลการวิจัยนี้นำเสนอในรูปแบบรายงานการตีพิมพ์ในวารสาร Microbial Cell Factories ซึ่งเป็นวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติที่มีต้องผ่านการกลั่นกรองโดยผู้ทรงคุณวุฒิ มีค่า impact factor โดย ISI = 3.34 คือ ซึ่งข้าพเจ้าเป็นผู้เขียนหลัก (corresponding author)

Do, B. C.; Dang, T. T.; Berrin, J. G.; Haltrich, D.; To, K. A.; Sigoillot, J. C.; Yamabhai, M., Cloning, expression in *Pichia pastoris*, and characterization of a thermostable GH5 mannan endo-1,4-beta-mannosidase from *Aspergillus niger* BK01. Microb Cell Fact 2009, 8, 59.

ผู้ที่ลงมือทำงานวิจัยนี้ส่วนใหญ่คือ นาย โด เบียน เค็ง ซึ่งเป็นนักศึกษาระดับปริญญาเอก แลกเปลี่ยนจากประเทศเวียดนาม เป็นงานวิจัยศึกษาเอนไซม์ mannanase ที่สกัดได้จากเชื้อรา *Aspergillus niger* ที่ผ่านการคัดหามาจากอาหารหมักในประเทศเวียดนาม งานวิจัยเริ่มต้นตั้งแต่การนำเชื้อที่พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ mannanase ที่มีคุณภาพดีมาทำการคัดแยกให้บริสุทธิ์ จากนั้นทำการสกัด mRNA และโคลนยีน mannanase ด้วยวิธีการ RT-PCR แล้วนำยีนที่ได้ไปโคลนเข้าไว้ในพลาสมิดสำหรับการแสดงออกโดย *Pichia pastoris* expression system จากนั้นทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ และการทำให้บริสุทธิ์ แล้วจึงนำเอนไซม์ที่บริสุทธิ์แล้วไปวิเคราะห์หาคุณสมบัติต่างๆ ผลการวิเคราะห์พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ได้จำนวนมาก เอนไซม์มีคุณสมบัติทนความร้อนสูง เหมาะกับการนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรม ดังรายละเอียดในผลงานตีพิมพ์ที่ปรากฏในหน้าต่อไป

Research

## Cloning, expression in *Pichia pastoris*, and characterization of a thermostable GH5 mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase from *Aspergillus niger* BK01

Do Bien-Cuong<sup>1</sup>, Dang Thi-Thu<sup>1</sup>, Jean-Guy Berrin<sup>2</sup>, Dietmar Haltrich<sup>3</sup>,  
To Kim-Anh<sup>1</sup>, Jean-Claude Sigoillot<sup>2,4</sup> and Montarop Yamabhai\*<sup>5</sup>

Address: <sup>1</sup>Institute of Biological and Food Technology, Hanoi University of Technology, Hanoi, Vietnam, <sup>2</sup>INRA, UMR1163 de Biotechnologie des Champignons Filamenteux, ESIL, 163 avenue de Luminy, CP 925, 13288 Marseille Cedex 09, France, <sup>3</sup>BOKU - University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna, Austria, <sup>4</sup>Université de Provence, UMR1163 de Biotechnologie des Champignons Filamenteux, ESIL, 163 Avenue de Luminy, CP 925, 13288 Marseille Cedex 09, France and <sup>5</sup>School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, 111 University Avenue, Nakhon Ratchasima, 30000, Thailand

Email: Do Bien-Cuong - [dobiencuong-ibft@mail.hut.edu.vn](mailto:dobiencuong-ibft@mail.hut.edu.vn); Dang Thi-Thu - [dangthudhbk@yahoo.com](mailto:dangthudhbk@yahoo.com); Jean-Guy Berrin - [jean-guy.berrin@univmed.fr](mailto:jean-guy.berrin@univmed.fr); Dietmar Haltrich - [dietmar.haltrich@boku.ac.at](mailto:dietmar.haltrich@boku.ac.at); To Kim-Anh - [tokimanh@mail.hut.edu.vn](mailto:tokimanh@mail.hut.edu.vn); Jean-Claude Sigoillot - [jean-claude.sigoillot@esil.univmed.fr](mailto:jean-claude.sigoillot@esil.univmed.fr); Montarop Yamabhai\* - [montarop@sut.ac.th](mailto:montarop@sut.ac.th)

\* Corresponding author

Published: 13 November 2009

Received: 18 July 2009

Accepted: 13 November 2009

*Microbial Cell Factories* 2009, **8**:59 doi:10.1186/1475-2859-8-59

This article is available from: <http://www.microbialcellfactories.com/content/8/1/59>

© 2009 Bien-Cuong et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

### Abstract

**Background:** Mannans are key components of lignocellulose present in the hemicellulosic fraction of plant primary cell walls. Mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidases (1,4- $\beta$ -D-mannanases) catalyze the random hydrolysis of  $\beta$ -1,4-mannosidic linkages in the main chain of  $\beta$ -mannans. Biodegradation of  $\beta$ -mannans by the action of thermostable mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase offers significant technical advantages in biotechnological industrial applications, i.e. delignification of kraft pulps or the pretreatment of lignocellulosic biomass rich in mannan for the production of second generation biofuels, as well as for applications in oil and gas well stimulation, extraction of vegetable oils and coffee beans, and the production of value-added products such as prebiotic manno-oligosaccharides (MOS).

**Results:** A gene encoding mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase or 1,4- $\beta$ -D-mannan mannanohydrolase (E.C. 3.2.1.78), commonly termed  $\beta$ -mannanase, from *Aspergillus niger* BK01, which belongs to glycosyl hydrolase family 5 (GH5), was cloned and successfully expressed heterologously (up to 243  $\mu$ g of active recombinant protein per mL) in *Pichia pastoris*. The enzyme was secreted by *P. pastoris* and could be collected from the culture supernatant. The purified enzyme appeared glycosylated as a single band on SDS-PAGE with a molecular mass of approximately 53 kDa. The recombinant  $\beta$ -mannanase is highly thermostable with a half-life time of approximately 56 h at 70°C and pH 4.0. The optimal temperature (10-min assay) and pH value for activity are 80°C and pH 4.5, respectively. The enzyme is not only active towards structurally different mannans but also exhibits low activity towards birchwood xylan. Apparent  $K_m$  values of the enzyme for konjac glucomannan (low viscosity), locust bean gum galactomannan, carob galactomannan (low viscosity), and 1,4- $\beta$ -D-mannan (from carob) are 0.6 mg mL<sup>-1</sup>, 2.0 mg mL<sup>-1</sup>, 2.2 mg mL<sup>-1</sup> and 1.5 mg mL<sup>-1</sup>, respectively, while the  $k_{cat}$  values for these substrates are 215 s<sup>-1</sup>, 330 s<sup>-1</sup>, 292 s<sup>-1</sup> and 148 s<sup>-1</sup>, respectively. Judged from the specificity constants  $k_{cat}/K_m$ , glucomannan is the preferred substrate of the *A. niger*  $\beta$ -



mannanase. Analysis by thin layer chromatography showed that the main product from enzymatic hydrolysis of locust bean gum is mannobiose, with only low amounts of mannotriose and higher manno-oligosaccharides formed.

**Conclusion:** This study is the first report on the cloning and expression of a thermostable mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase from *A. niger* in *Pichia pastoris*. The efficient expression and ease of purification will significantly decrease the production costs of this enzyme. Taking advantage of its acidic pH optimum and high thermostability, this recombinant  $\beta$ -mannanase will be valuable in various biotechnological applications.

## Background

$\beta$ -1,4-Mannans are among the main hemicellulose components that are widespread in wood, tubers, plant seeds and beans [1,2]. The structural diversity of mannans allows for a wide range of physico-chemical properties. When some of the mannose residues are replaced by glucose residues, as in the glucomannans, or substituted with galactose residues, as in galactomannans, the water-solubility of the polymers increases, whereas pure mannans are insoluble [3]. In lignocellulosic biomass these polysaccharides associate with lignin and cellulose, protecting the fibers against degradation by cellulases and microbial attack [1]. Lignocellulose is seen as a promising feedstock for the production of second-generation biofuels. For this application, the carbohydrate components in lignocellulose should be completely converted into ethanol, and enzymatic degradation of these polysaccharides is an attractive approach.

Thermostability of the employed enzymes is essential during the pre-treatment step in the conversion of lignocellulosic biomass to fermentable sugars, since steam is used to make the biomass more accessible to enzymatic attack. Thus, enzymatic hydrolysis can take place directly after the heating step, without the need to significantly pre-cool the system; hence shortening processing time, saving energy, lowering of risk of contamination, and improving saccharification and fermentation yields. Thus, overall economy of the process can be increased [4,5]. Furthermore, the saccharification step can be combined with the fermentation (simultaneous saccharification and fermentation, SSF) in order to reduce the inhibition of hydrolysis by glucose or other monosaccharides. Since fermentations for bioethanol will be run under aseptic conditions to reduce costs, increased fermentation temperatures will reduce the risk of microbial contamination. Therefore, increased thermostability for the saccharification enzymes is preferable.

Biodegradation of  $\beta$ -mannans by the action of thermostable mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase or 1,4- $\beta$ -D-mannan mannanohydrolase (E.C. 3.2.1.78), commonly known as  $\beta$ -mannanase, offers significant technical advantages for

delignification of kraft pulps [6] and for various industrial applications, such as oil and gas well stimulation [2,7], extraction of vegetable oils or coffee beans [6,8], bioconversions of non-utilized lignocellulosic substrates rich in mannan into added-value products (e.g., chemicals, feed, prebiotic manno-oligosaccharides) [2,9], or for the production of second generation biofuels [8-10].

Mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidases, which are stable and efficiently functional at high temperatures, are found in several thermophilic bacteria, eubacteria [7,10-12], actinomycetes [13] and fungi [4,8,14,15]. Some genes encoding thermostable mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase of bacterial origin have been cloned, sequenced and expressed in *E. coli* [11,16]. Most of these enzymes belong to glycosyl hydrolase family 26 (GH26) according to the Carbohydrate Active Enzymes database, <http://www.cazy.org> [17]. Mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidases that belong to glycosyl hydrolase family 5 (GH5) are found in bacteria [18], fungi [19] as well as higher plants [20]. Up to now, only one thermostable GH5 mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase gene from the fungus *Bispora* sp. MEY-1 was cloned and expressed in *Pichia pastoris* [15].

Our preliminary studies showed that the recently isolated strain *Aspergillus niger* BK01 (formerly termed *Aspergillus* sp. BK) produced thermostable mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase activity [21]. However, the high viscosity of the induction media containing guar gum and coffee pulp waste caused difficulties for fermentation and thus limited the scale-up for the production of this enzyme on an industrial scale. Molecular biology technology provides an opportunity to express and subsequently purify *A. niger* mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase in host strains capable of producing large amounts of secreted protein by industrial-scale fermentations based on well-established protocols [22].

This report describes cDNA cloning and successful heterologous expression of a novel thermostable GH5 mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase gene from *A. niger* BK01 in *P. pastoris*. In addition, several biochemical properties of the recombinant enzyme are reported.

**Results**

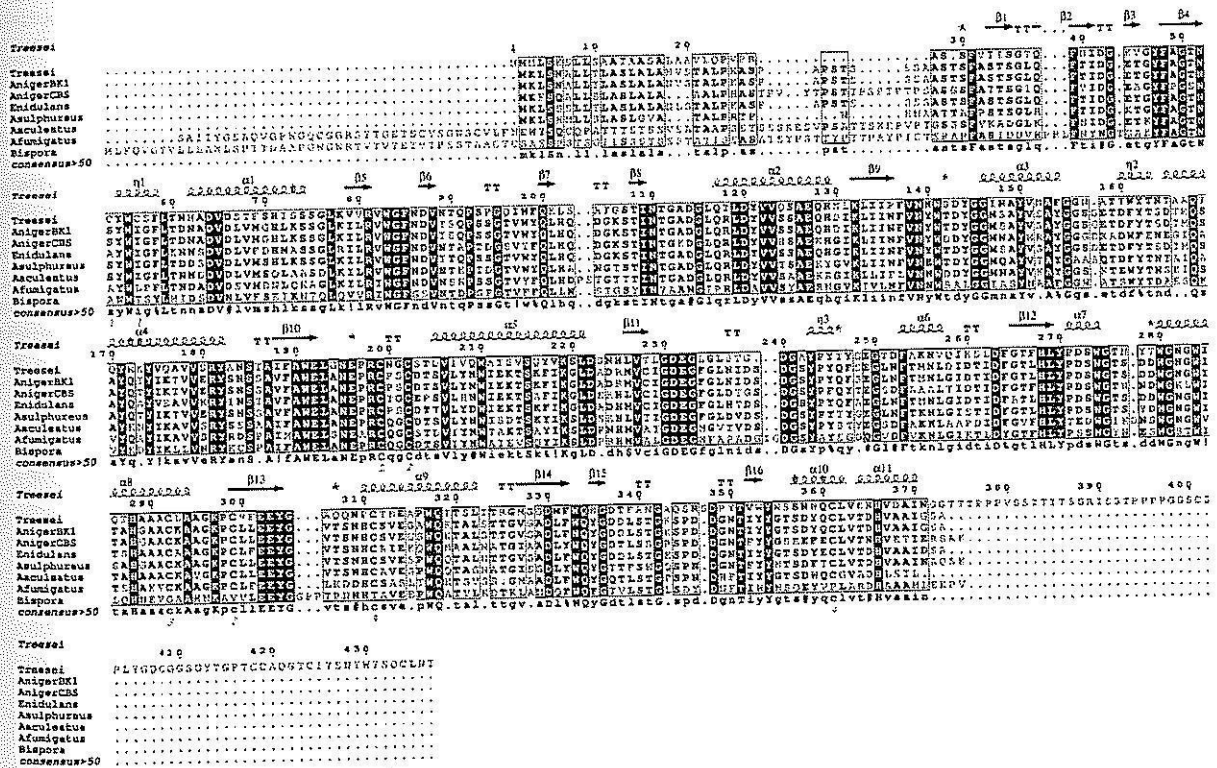
**Cloning and sequence analysis of the mannan endo-1,4-β-mannosidase gene from *A. niger* BK01**

A 1035-nucleotide sequence encoding the mature mannan endo-1,4-β-mannosidase from *Aspergillus niger* BK01 (GenBank accession number [FJ268574](#)) was amplified by RT-PCR as described in the Methods section. The deduced amino acid sequence showed 70 to 93% similarity to different *Aspergillus* β-mannanases (Fig. 1). The enzyme belongs to glycosyl hydrolase family 5 [17]. It shows several characteristics common to all of the mannan endo-1,4-β-mannosidases in this family, for example a catalytic center containing catalytically/structurally important Asn, Glu, and His residues. Two catalytic glutamates (Glu196, Glu303) and five out of the six active site residues (Arg81, His129 and His268, Asn195, Tyr270, Trp333) are con-

served, corresponding to the known structures of other GH5 mannan endo-1,4-β-mannosidases [13,23].

**Heterologous expression of the *A. niger* mannan endo-1,4-β-mannosidase in *P. pastoris***

The nucleotide sequence encoding the mature form of *A. niger* BK01 mannan endo-1,4-β-mannosidase was cloned into the pPICZαA vector. The recombinant enzyme was constructed such that the native signal peptide of the *A. niger* β-mannanase was replaced by that of the *Saccharomyces cerevisiae* α-factor signal peptide. The resulting plasmid was then transformed into *P. pastoris* by electroporation. After transformation and primary screening on plates containing Zeocin in varying concentrations, antibiotic-resistant transformants were evaluated for their ability to secrete active mannanase on plates containing Azo-carob galactomannan (BMGY-Azo). Among 40 transformants



**Figure 1**  
**Amino acid sequence alignment of mannan endo-1,4-mannosidase from *Aspergillus niger* BK01 and related fungi.** Multiple sequence alignment was done by CLUSTAL W [40] followed by ESPrnt [41] to display the secondary structures using *Trichoderma reesei* mannanase as a template (pdb no. [1qnr](#)). α-Helices are displayed as squiggles; β-strands are rendered as arrows, strict β-turns as TT letters. Percent similarities of mannan endo-1,4-β-mannosidase from *A. niger* BK01 (GenBank accession no. [FJ268574](#)) to other enzymes are 51% for *T. reesei* (GenBank accession no. [L25310](#)), 99% for *A. niger* CBS 513.88 (Genbank accession no. [XP\\_001390707](#)), 93% for *A. sulphureus* (GenBank accession no. [DQ328335](#)), 71% for *A. aculeatus* (GenBank accession no. [L35487](#)), 66% for *Emicella nidulans* (GenBank accession no. [DQ490487](#)), 56% for *Aspergillus fumigatus* (GenBank accession no. [EU925594](#)), and 43% for *Bispora* sp. MEY-1 (GenBank accession no. [EU919724](#)).

displaying mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase activity on the agar plates, the clone yielding the largest clearing halo was selected for cultivation in liquid culture.

Under appropriate conditions (2% methanol, initial cell density  $6 \times 10^7$  cells mL<sup>-1</sup>, pH 6.0) the highest extracellular mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase activity (669 U mL<sup>-1</sup>) could be obtained after a 96-hour incubation at 28°C. No  $\beta$ -mannanase activity was detected in the culture medium of the control strain under identical culture conditions. SDS-PAGE analysis of the crude supernatants at the induction period from 24 to 96 h showed a single band of 53 kDa (Fig. 2A), corresponding to mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase activity in the zymogram analysis (Fig. 2B). The ratio of secreted to intracellular  $\beta$ -mannanase activity was estimated to be approximately 3:1 (data not shown).

#### Purification of recombinant mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase

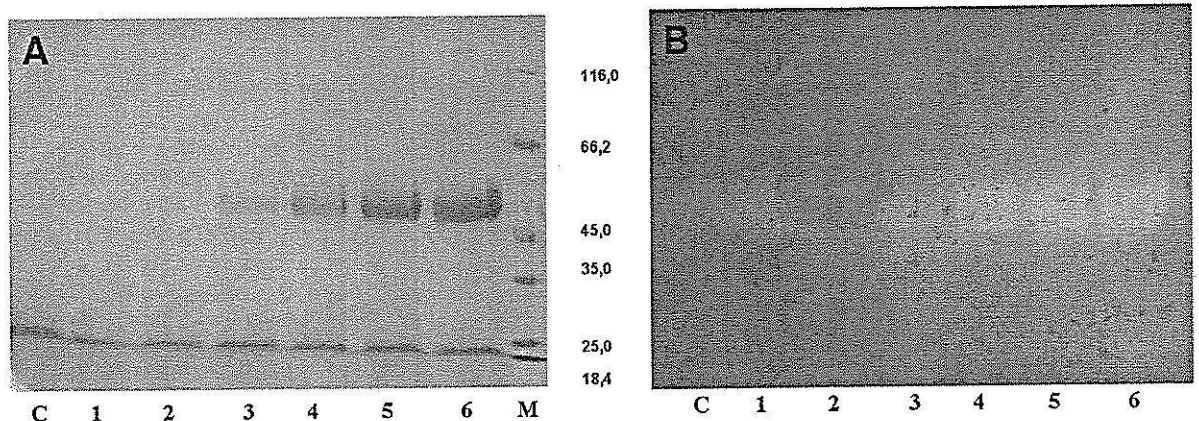
The recombinant enzyme could be purified to apparent homogeneity both by immobilized metal affinity (IMAC) chromatography and size exclusion chromatography on Superdex. However, we found that the yield of the purified enzyme after chromatography on the Superdex column was higher (data not shown). This might be due to instability of the recombinant  $\beta$ -mannanase in the buffer at pH 7.5, which was used for equilibration and elution during IMAC chromatography. After purification on the Superdex column as described in the Methods section, the specific activity of the purified enzyme (2570 U mg<sup>-1</sup>)

showed a 5.5-fold increase compared with the crude culture supernatant of *P. pastoris* (Table 1).

Purified recombinant mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase displayed one single band with an apparent molecular mass of 53 kDa on SDS-PAGE. When the enzyme was treated with Endoglycosidase H, the apparent molecular mass of the deglycosylated enzyme was approximately 47 kDa (Fig. 3), indicating that mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase is a glycoprotein, which is glycosylated to a degree of approximately 12%. IEF revealed one single isoform of pI 4.7 (not shown), in good agreement with the theoretical pI deduced from the amino-acid sequence.

#### Characterization of recombinant mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase

**Effect of temperature and pH on enzyme activity and stability**  
The effect of temperature and pH were investigated on recombinant *A. niger* BK01 mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase using locust bean gum mannan as substrate. The enzyme displayed over 50% activity in the temperature range of 50 to 90°C with an optimal temperature at 80°C for the 10-min assay at pH 6.0 (Fig. 4). The enzyme was stable up to 70°C. Practically all of its activity (>98%) was retained after a 4-h incubation at 70°C, and the half-life time at this temperature was 56 h. At 80°C the half-life time of activity of *A. niger*  $\beta$ -mannanase was only 15 min, and at 90°C about 90% of its activity was lost within 2.5 min of incubation (Fig. 5). The optimal pH for mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase (at 80°C) was pH 4.5, and more than 80% of its maximal activity was retained within a



**Figure 2**  
**SDS-PAGE and zymogram analysis of recombinant *A. niger* mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase.** SDS-PAGE (A) and zymogram (B) of secreted proteins from recombinant *Pichia pastoris* expressing the *A. niger*  $\beta$ -mannanase are shown. Lane M, molecular mass standard protein; Lane 1-6, culture supernatant after induction for 6, 24, 36, 48, 72 and 96 h, respectively; Lane C, control of *P. pastoris* X33 harbouring the empty pPICZ $\alpha$ A vector after induction for 96 h. Twelve  $\mu$ L of culture supernatant was loaded onto each lanes.

**Table 1: One-step purification of recombinant  $\beta$ -mannanase from *A. niger***

Step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U mg <sup>-1</sup> )	Degree of purification (fold)	Yield (%)
Culture supernatant	42.6	20870	471	1.0	100
Superdex 75	3.9	10200	2570	5.5	50.7

rather broad pH range (from pH 4.0-5.5) (Fig. 6). The enzyme was stable in a narrow range around its optimal pH value (pH 4.5-5.0) (Fig. 7)

#### Effect of metal ions and chemical reagents on mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase activity

The relative activities (in parenthesis) of the enzyme after incubation with various reagents revealed that mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase from *A. niger* BK01 was strongly inhibited by sodium dodecyl sulfate, SDS (20.5%), and Mn<sup>2+</sup> (34.9%), and slightly inhibited by phenylmethylsulphonyl fluoride, PMSF (75.2%), Na<sup>+</sup> (72.6%), Zn<sup>2+</sup> (86.6%), Mg<sup>2+</sup> (87.4%), K<sup>+</sup> (89.7%), Ca<sup>2+</sup> (90.5%) and Fe<sup>2+</sup> (95.8%). On the contrary, EDTA (235.6%) and Cu<sup>2+</sup> (110%) could activate this enzyme.

#### Substrate specificity and kinetics parameters

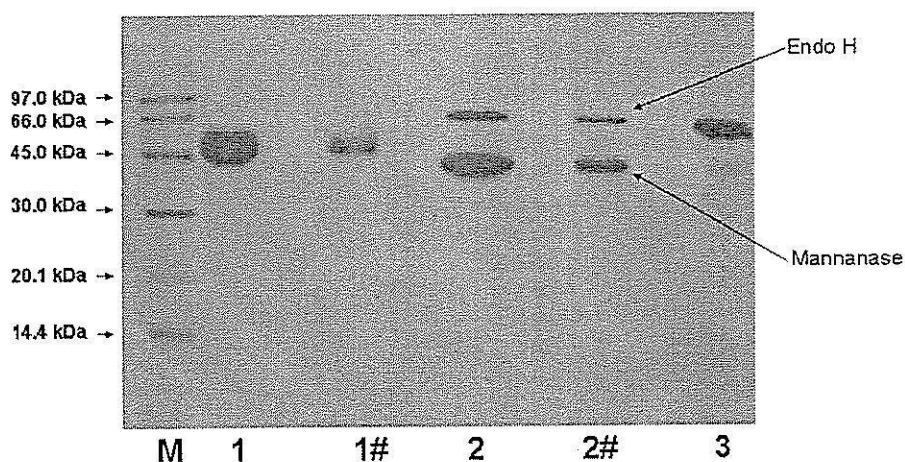
The relative activity of the purified enzyme on various substrates was determined as described in Methods. Mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase from *A. niger* exhibited high activity on locust bean gum (100%), but showed considerably less activity on guar gum (17.9% relative activity)

and birchwood xylan (9.1%). Its activity is negligible on starch, carboxymethylcellulose and  $\alpha$ -cellulose (<0.1%).

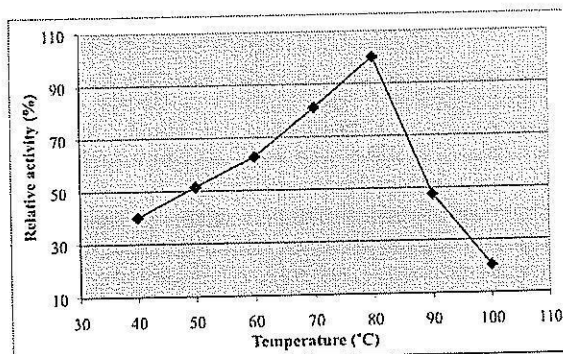
The Michaelis-Menten constants were determined for mannan-containing polysaccharides from various sources (Table 2). These substrates have different structures because of the different ratios of monomers found in the backbone and side chain substituents. For example, glucomannan from konjac has a glucose to mannose ratio of 0.66 to 1; galactomannan from locust bean gum (Sigma) has a mannose to galactose ratio of 4:1, while those from carob (Megazyme) and guar gum have a mannose to galactose ratio of 3.76:1 and 1.6:1, respectively. The  $K_m$  and  $k_{cat}$  values were 0.6 mg mL<sup>-1</sup> and 215 s<sup>-1</sup> for low viscosity glucomannan from konjac, 2.0 mg mL<sup>-1</sup> and 330 s<sup>-1</sup> for locust bean gum galactomannan, 2.2 mg mL<sup>-1</sup> and 292 s<sup>-1</sup> for low viscosity galactomannan from carob, 1.5 mg mL<sup>-1</sup> and 148 s<sup>-1</sup> for  $\beta$ -mannan from carob, and 7.7 mg mL<sup>-1</sup> and 352 s<sup>-1</sup> for guar galactomannan.

#### Product analysis

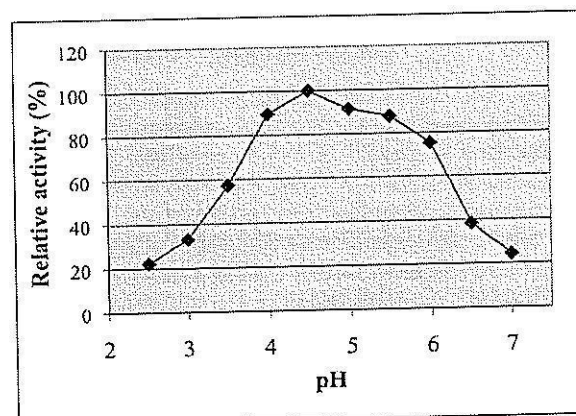
Analysis of oligosaccharide products obtained during enzymatic hydrolysis of locust bean gum using thin layer

**Figure 3**

**Deglycosylation of recombinant *A. niger* mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase.** SDS-PAGE analysis of the recombinant mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase after deglycosylation with endoglycosidase H. Lane M: molecular mass standard protein; Lane 1: purified  $\beta$ -mannanase; Lane 1#: diluted purified  $\beta$ -mannanase; Lane 2: deglycosylated  $\beta$ -mannanase after endoH treatment; Lane 2#: diluted deglycosylated  $\beta$ -mannanase; Lane 3: endoglycosidase H.



**Figure 4**  
Effect of temperature on mannan endo- $\beta$ -1,4-mannosidase activity. The optimal temperature was determined using 0.5% locust bean gum in 0.1 M citrate-phosphate buffer, pH 4.0, in the 10-min assay.



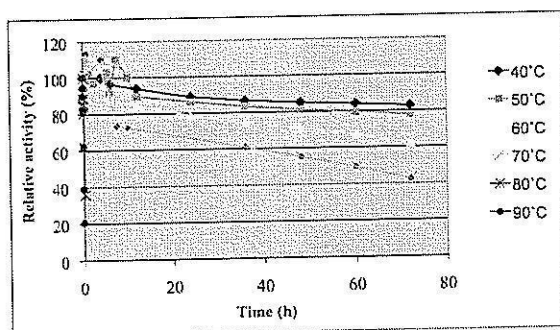
**Figure 6**  
Effect of pH on mannan endo- $\beta$ -1,4-mannosidase activity. The optimal pH was determined at 80°C using 0.5% LBG in 0.1 M citrate-phosphate buffer over a pH range of 2.5-7.0.

chromatography revealed that the recombinant mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase from *A. niger* yields mannobiose as its main product, and a small amount of different oligosaccharides (Fig. 8). No trace of mannose could be detected in these hydrolysis experiments.

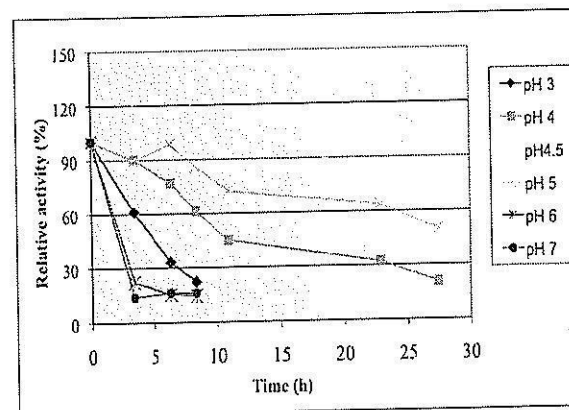
### Discussion

The mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase of *A. niger* BK01 and the hypothetical protein (An05 g01320) of *A. niger* CBS513.18 are highly similar with 99% amino acid sequence identity, and 98% DNA sequence similarity. Their amino acid sequences also match the N-terminal sequence of native *A. niger* mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase that was reported in 1998 [24]. We have thoroughly

searched the databases and could not find any report on cloning, expression, and characterization of an *A. niger* mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase. Thus, our work is the first report on cloning, expression and characterization of this enzyme. In addition, this work also helps verify the function of the hypothetical protein (An05 g01320) of *A. niger* CBS513.18 that has been reported to have strong similarity to mannanase (man1) from *A. aculeatus*.  $\beta$ -Mannanases from *A. niger* BK01 [21], *A. niger* CBS513.18 and *A. niger* published by Ademark et al [24] appear to be



**Figure 5**  
Effect of temperature on stability of *A. niger* BK01  $\beta$ -mannanase. The temperature stability is shown as relative residual activity after incubation without substrate at different temperatures and at pH 4.0.



**Figure 7**  
Effect of pH on stability of *A. niger* BK01  $\beta$ -mannanase. The pH stability was reported as relative residual activity after the enzyme was incubated in 0.1 M citrate-phosphate buffer at various pHs without substrate for different periods of time at 50°C.

Table 2: Kinetic parameters for the purified mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase<sup>a</sup> at 70°C

Substrate	$V_{max}$ (U mg <sup>-1</sup> )	$K_m$ (mg mL <sup>-1</sup> )	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_m$ (mg <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> mL)
Glucomannan	243 ± 15	0.6 ± 0.3	215	358
Locust bean gum	373 ± 19	2.0 ± 0.4	330	165
Galactomannan	330 ± 9	2.2 ± 0.2	292	133
Mannan	167 ± 5	1.5 ± 0.2	148	98.4
Guar gum	398 ± 48	7.7 ± 1.8	352	45.7

<sup>a</sup> Enzymatic reactions were carried out for 5 min at 70°C in 0.07 M citrate phosphate buffer (pH 4.5).

closely related and have similar properties, which are superior than those from *A. niger* NRRL 337 [25]. Mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidases from other *Aspergillus* species e.g., those from *A. aculeatus*, *A. fumigatus* or *A. sulphureus*, have previously been cloned and expressed in various hosts [26-31]. *A. niger*  $\beta$ -mannanase has unique properties that are different from other *Aspergillus* mannanases. Amino acid sequence of *A. niger* BK01 mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidases including putative signal peptide can be found in additional file 1.

Mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidases or  $\beta$ -mannanases have been classified into two family of glycoside hydrolases, i.e., family 5 and 26, based on their sequence similarity <http://www.cazy.org>. The *A. niger* mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase belongs to glycoside hydrolase family 5 (GH5). Analysis of the primary sequence of fungal mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidases belonging to this family

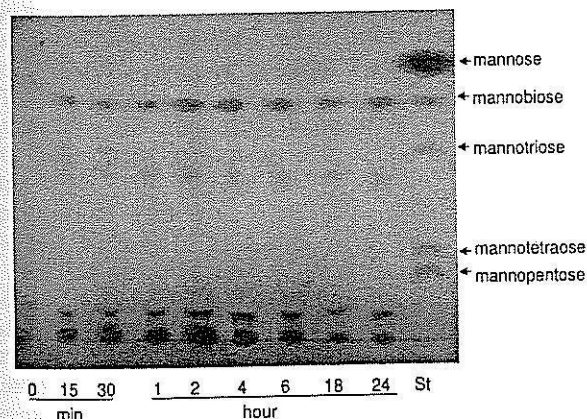


Figure 8

**Thin layer chromatography analysis.** Products from locust bean gum hydrolysis by recombinant *A. niger* mannanase at various time points were separated on silica plates. Incubation times (hour or minute) are indicated. Lane St indicates authentic standards, i.e. a mixture of mannose to mannopentaose. Ten  $\mu$ L of hydrolysate was spotted onto each lane.

revealed amino acid sequence similarities ranging from 43 to 93%. Some fungal  $\beta$ -mannanases have been shown to contain a cellulose-binding domain (CBD) at either the C-terminus or N-terminus of the enzyme. For example, CBD of *T. reesei*  $\beta$ -mannanase is located at its C-terminus (amino acid position 373-410) preceded by a serine-, threonine-, and proline-rich region [29], whereas CBD of *A. fumigatus*  $\beta$ -mannanase is located at its N-terminus (amino acid position 9-44) as shown in Fig. 1. A role of this domain in the hydrolysis of mannan/cellulose complex substrates has been suggested [32]. However,  $\beta$ -mannanases from different fungi including *A. niger* do not contain a CBD. The protruding N-terminus of *Bispora* sp. as shown in the sequence alignment in Fig. 1 is not similar to a CBD, and its role in catalysis still remains to be explored.

The mature *A. niger* mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase gene without its signal peptide was expressed in *P. pastoris* X33 with the C-terminus of the recombinant enzyme fused to the 6xHis tag for affinity purification by immobilized metal affinity chromatography (IMAC). The native signal peptide was replaced with that of the *Saccharomyces cerevisiae*  $\alpha$ -factor, allowing secretion of the active enzyme into the extracellular medium with an expression yield of approximately 243 mg L<sup>-1</sup>. Since cultivation experiments were done in shake flasks, one can expect that growth of *P. pastoris* in a fermentor under controlled and optimised conditions will result in considerably higher protein yields [33]. In comparison, the expression level of *Trichoderma reesei* mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase in *S. cerevisiae* was roughly 150 mg L<sup>-1</sup> [29] and that of *Bispora* sp. MEY-1 [15] and *B. subtilis* mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase in *P. pastoris* GS115 [34] was 1800 mg L<sup>-1</sup> and 150 mg L<sup>-1</sup>, respectively. Moreover, the enzyme activity during fermentation reached 670 U mL<sup>-1</sup>, which is significantly higher than those reported for most mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidases [26,34].

Amino acid sequence analysis by the NetNGlyc 1.0 server program indicated two putative N-glycosylation sites in the amino acid sequence of mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase i.e., <sup>195</sup>NSS<sup>197</sup>, and <sup>252</sup>NFT<sup>254</sup> (according to num-

bering in Fig. 1). The deglycosylation analysis, showed in Fig. 3, confirms the prediction that the enzyme is glycosylated. Purified mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase treated with Endoglycosidase H was calculated to be 43 kDa by SDS-PAGE. This result indicated that the *A. niger* mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase expressed in *P. pastoris* was properly glycosylated, as the enzyme was as active as the native enzyme.

Recombinant *A. niger* BK01 mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase efficiently hydrolysed galactomannans, glucomannans and  $\beta$ -1,4-mannans from different sources. Although determination of kinetic parameters enabled us to demonstrate that *A. niger* GH5 mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase was highly active towards structurally different mannans, this enzyme displayed highest specificity towards unsubstituted carob glucomannan with a  $K_m$  and  $k_{cat}$  of 0.6 mg.mL<sup>-1</sup> and 2.15 s<sup>-1</sup>, respectively. Based on these kinetic parameters, mannanase activity of this enzyme appears not to be hampered by the presence of side chains, i.e. galactosyl residues. The enzyme can hydrolyse galactomannans as well as glucomannans and unsubstituted  $\beta$ -1,4-mannan. The action of the enzyme on these substrates as well as on Azo-carob galactomannan, a standard substrate for the assessment of mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase activity, indicates its function as a true endo- $\beta$ -1,4-mannanase. This activity was confirmed by TLC analysis of reaction products obtained through hydrolysis of locust bean gum, which gave mannobiose as major product and no detectable mannose, indicating that the enzyme has no  $\beta$ -mannosidase activity. In addition to mannan, *A. niger* mannanase was capable of degrading birchwood xylan (9.1% relative activity). Its lacks of activity for cellulose is valuable for applications in bleaching pulp and paper [1].

In general, the properties of the recombinant mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase from *A. niger* are very similar to those of the enzyme from its natural source with only some minor differences. The recombinant *A. niger* mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase furthermore shows properties typical of thermostable enzymes, which is in accordance with the wild-type enzyme. The optimal temperature of its activity is 80 °C, similar to that of the native enzyme [21]. Optimal temperatures of different fungal  $\beta$ -mannanases have previously been reported; that of the  $\beta$ -mannanase from *Trichoderma reesei* C-30 was found at 75 °C [35], whereas  $\beta$ -mannanase produced from *A. niger* and *A. flavus* showed their optimum at 65 and 60 °C, respectively [14]. Two forms of mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase from the thermotolerant fungus *A. fumigatus* IMI 385708 showed highest activity at 60 °C (pH 4.5) [6]. These rather high optima appear to be a common but valuable characteristic of fungal  $\beta$ -mannanases. At such high temperatures (above 60-65 °C), enzymatic digestion may

not only increase the rate of hydrolysis but also reduce microbial contamination of the material being processed [36].

Both native and recombinant *A. niger* mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase appear to be among the most thermostable fungal  $\beta$ -mannanases reported to date. The recombinant *A. niger* mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase retained >98% activity after 4 h at 70 °C, while mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase from *Talaromyces emersonii* and *Aspergillus niger* NRRL 337 retained 53% and 20% activity after 1 h at 65 °C, respectively [36]. The half-life of thermostable acidic mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase from *Sclerotium (Athelia) rolfsii* at 70 °C and pH 4.5 was 1.5 h [37], while that of recombinant *A. niger* mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase at 70 °C was 56 h. *Bispora* sp. MEY-1 mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase, which was expressed in *P. pastoris*, only retained more than 50% of its initial activity after an incubation at 70 °C for 20 min [15].

The strong increase of the enzyme activity in the presence of EDTA (1 mM) suggests that metal ions are not present in the active site and are not required for activity. At the same concentration, the effect of EDTA on *A. sulphureus*  $\beta$ -mannanase activity was only moderate [26]. EDTA might protect the enzyme against the detrimental effect of metal ions present in the enzyme preparation, which inhibit the *A. niger*  $\beta$ -mannanase to a certain extent while not affecting the *A. sulphureus* enzyme significantly. For example, Mn<sup>2+</sup> strongly inhibited the *A. niger*  $\beta$ -mannanase but did not effect the latter enzyme. Other ions including Na<sup>+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> exerted an adverse effect on the activity of *A. niger*  $\beta$ -mannanase but did not affect or slightly increased the *A. sulphureus*  $\beta$ -mannanase activity [26]. The  $\beta$ -mannanase activity inhibition in the presence of PMSF (1 mM) was 24.8%, suggesting the role of a serine in the catalytic action of *A. niger* mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase.

## Conclusion

To date, this study is the first report on production of a thermostable GH5 mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase from *A. niger* using a *P. pastoris* expression system. This kind of thermostable enzyme can gain a great deal of interest for industrial applications in large scale due to an increasing demand towards renewable resource utilization in the near future.

## Methods

### Strains, plasmids, enzymes, reagents, and growth media

*Aspergillus niger* strain BK01, isolated from an orange in Vietnam, was identified by the Center of Biotechnology, Vietnam National University, Hanoi, and is preserved in our laboratory. *Escherichia coli* strain TOP 10 (Invitrogen) was used as a host for molecular cloning of DNA in pPIC-

Z $\alpha$ A (Invitrogen) and propagation of recombinant expression vectors. *Pichia pastoris* X33 (Invitrogen) was used for heterologous protein expression. All media and protocols for *Pichia* are described in the *Pichia* expression manual (Invitrogen). Manno-oligosaccharides were from Megazyme (Bray, Ireland).

#### Total RNA isolation, cDNA synthesis and cloning of the mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase gene

*A. niger* BK01 was grown at 37 °C for 48 h in a plate containing 10 mL liquid modified Czapek medium including locust bean gum as a sole carbon source (5 g L<sup>-1</sup>). The mycelium was then transferred to a plate containing 10 mL  $\beta$ -mannanase induction medium based on modified coffee pulp waste (21.6 g L<sup>-1</sup>) and guar gum (10 g L<sup>-1</sup>) [21]. After a 72-h growth period, the mycelium was harvested. Total RNA was isolated by extracting 50 mg of mycelium using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). cDNA was synthesized from RNA using One Step RT-PCR Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The primers used were CF (5'-ATG AAG CTT TCC AAC GCC CTC CTC-3') and CR (5'-TTA AGC ACT ACC AAT AGC AGC AAC ATG ATC-3'), which were designed according to the amino acid sequence of the putative mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase from *A. niger* CBS 513.88 (Genbank accession no. [XP\\_001390707](#)). The thermocycling parameters were: 50 °C for 35 min, 95 °C for 15 min and 30 cycles of 94 °C - 30 s, 54 °C - 45 s and 72 °C - 90 s, followed by 10 min extension at 72 °C.

To subclone the mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase cDNA into the expression vector, the  $\beta$ -mannanase-encoding sequence was amplified from the previously isolated cDNA with the primers Pnf (5'-CTG TGC GAA TTC TCC TTC GCC AGC ACC TCC G-3'), including an *Eco*RI site, and PRv (5'-CTG TGC TCT AGA GCA CTA CCA ATA GCA GCA ACA TGA TCC -3'), including a *Xba*I site, using a mixture of *Pfu* DNA polymerase (3 U/reaction) and *Taq* DNA polymerase (3 U/reaction). The thermocycling parameters were 95 °C for 2 min, and 30 cycles of 95 °C for 45 s, 59 °C - 45 s and 72 °C - 3 min. The DNA insert was cloned into *Eco*RI and *Xba*I sites of the pPICZ $\alpha$ A vector, downstream of the  $\alpha$ -factor signal peptide sequence. Proper construction was confirmed by restriction digestion and automated DNA sequencing (Macrogen Inc., Korea). The DNA sequence encoding mature mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase was deposited in the GenBank database under accession no. [F1268374](#).

#### Expression of the mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase gene in *Pichia pastoris*

The selected expression plasmid was linearized with *Sac*I (New England BioLabs, USA), and then transformed into *P. pastoris* strain X33 by electroporation [22]. Transformants were first screened from YPDS (1% yeast extract, 2%

peptone, 2% dextrose, 1 M sorbitol, 2% agar) plates containing Zeocin™ at a final concentration of 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, then on YPDZ plates (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose and 2% agar containing Zeocin at final concentrations of 150, 300, and 500  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) in order to screen for higher copy numbers of the targeted gene. Recombinant strains producing mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase were further confirmed by BMGY-Azo plates (1% yeast extract, 2% peptone, 100 mM potassium phosphate pH 6.0, 1.34% YNB, 4  $\times$  10<sup>-5</sup> % biotin, 0.5% methanol, 2% agar and 0.3% Azo-carob galactomannan). Mut<sup>+</sup> phenotype of *P. pastoris* recombinants was analysed by genomic PCR with 5'AOX and 3'AOX primers. The culture medium from the *P. pastoris* transformant that had the highest  $\beta$ -mannanase activity was used for the subsequent analysis of the recombinant protein. A control was transformed with an empty pPICZ $\alpha$ A plasmid.

#### Purification of recombinant mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase

All purification steps were performed at 4 °C unless stated otherwise. The crude culture supernatant was obtained by centrifugation of the culture broth at 4000 rpm for 5 min at 4 °C. The crude supernatant was concentrated 30-fold by ultrafiltration through a 10-kDa cut-off membrane (Sartorius Stedim Biotech, Germany). The final purification was done by size exclusion chromatography on a Superdex 75 HR 10/30 column (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden) equilibrated with 50 mM potassium phosphate buffer, pH 6.0, and the protein was eluted at a flow rate of 1 mL min<sup>-1</sup>. Active fractions were combined and used in further experiments as the purified  $\beta$ -mannanase.

#### Polyacrylamide gel electrophoresis and zymograms

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed in a 12.5% (w v<sup>-1</sup>) polyacrylamide gel by the method of Laemmli (1970). Proteins were stained with Coomassie brilliant blue G-250.

Zymograms were obtained by co-polymerizing 0.2% (w v<sup>-1</sup>) locust bean gum with 12.5% (w v<sup>-1</sup>) polyacrylamide gel as previously reported [38]. After electrophoresis, the gel was soaked in 2.5% cold Triton X100 with gentle shaking to remove SDS and re-fold the proteins in the gel. The gel was then washed four times at 4 °C in 50 mM potassium phosphate buffer pH 6.0 for 30 min. After incubation for 45 min at 50 °C, the gels were stained with Congo red solution (0.1%, w v<sup>-1</sup>), and destained with 1 M NaCl. The activity bands were observed as clear yellow halos.

Deglycosylation of recombinant  $\beta$ -mannanase Purified mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase was deglycosylated by denaturing the protein at 100 °C for 10 min prior to the addition of endoglycosidase H<sub>f</sub> (Endo H<sub>f</sub>, New England



Biolabs) at 37°C for 1 h according to the manufacturer's instructions.

#### ***β*-Mannanase assay and protein quantification**

Mannan endo-1,4-*β*-mannosidase activity was determined using the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method [39]. The reaction was started by mixing 0.1 mL of appropriately diluted enzyme sample with 0.9 mL of 5 mg mL<sup>-1</sup> locust bean gum in 0.1 M citrate-phosphate buffer, pH 4.0. After 10-min incubation at 50°C, the reaction was stopped by the addition of 5 mL DNS reagent. One unit of mannan endo-1,4-*β*-mannosidase activity is defined as the amount of enzyme releasing 1  $\mu$ mole of mannose equivalents per minute. All experiments were done in triplicate, and average values are reported. Protein concentration was determined with bovine serum albumin as standard, using the Micro-BCA Protein Assay Reagent (Biorad, USA).

#### **Effect of temperature, pH and various reagents on enzyme activity**

The optimal temperature for mannan endo-1,4-*β*-mannosidase activity (10-min assay) was determined by the standard activity assay as described above at various temperatures ranging from 40 to 100°C. To estimate thermal stability, the enzyme was pre-incubated in 0.1 M citrate-phosphate buffer (pH 4.0) at various temperatures (60-90°C) for different periods of time without substrate and then assayed for residual activity at 50°C using the standard activity assay. The effect of pH on *β*-mannanase activity was determined at 80°C over a pH range of 2.5-7.0 by using 0.1 M citrate-phosphate buffer. To estimate pH stability, the enzyme was diluted/pre-incubated in the same buffer at different pH-values for different periods of time at 50°C without substrate, and then assayed for residual activity at pH 4.0. The effect of ions on mannan endo-1,4-*β*-mannosidase activity was examined by incubating the enzyme with 1 mM of various metal ions in 0.1 M sodium citrate buffer (pH 4.0) at 50°C for 30 min.

#### **Substrate specificity and kinetic parameters**

The substrate specificity of purified recombinant mannan endo-1,4-*β*-mannosidase was evaluated with the following substrates at 5 mg mL<sup>-1</sup> in 0.1 M citrate-phosphate buffer, pH 4.0: locust bean gum (Sigma), guar gum (Sigma), birchwood xylan (Roth), soluble starch (Sigma-Aldrich),  $\alpha$ -cellulose and carboxyl methyl cellulose (Fluka). Activity was measured by the dinitrosalicylic acid (DNS) method as described above. For the kinetic experiments, 0.1 M citrate-phosphate buffer (pH 4.5) containing 0.1 to 10 mg mL<sup>-1</sup> of various mannan substrates (*i.e.*, locust bean gum (Sigma), guar gum (Sigma), carob galactomannan (low viscosity) (Megazyme), konjac glucomannan (low viscosity) (Megazyme), and carob 1,4-*β*-D-mannan (Megazyme), was incubated with the purified

mannan endo-1,4-*β*-mannosidase at 70°C for 5 min. Kinetic parameters ( $K_m$  and  $v_{max}$ ) were calculated from the experimentally obtained data and non-linear regression analysis using the "GraFit" software (Erithacus Software Ltd.).

#### **Thin layer chromatography**

Locust bean gum was prepared at a concentration of 1% (w v<sup>-1</sup>) in 50 mM sodium citrate buffer, pH 4.5. After addition of the purified enzyme (7.5 U for 2-mL reactions), the solution was incubated at 40°C. Aliquots were removed at various time, and heated to 100°C for 10 min. Hydrolysis products were separated on silica plates 60 F 254 (Merck, Darmstadt, Germany) using a solvent system consisting of 1-propanol-nitromethane-water (7:1:2, v v<sup>-1</sup>). The products were detected by spraying with 5% sulphuric acid in ethanol followed by heating at 110°C for about 5 min. Manno-oligosaccharides (mannose, manno-biose, mannotriose, mannotetraose and mannopentose, Megazyme) were used as standards.

#### **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

#### **Authors' contributions**

DBC performed most parts of the experiments and prepared the first draft of the manuscript. DTT and TKA directed the study. JBG checked all data, designed the frame of this publication and revised the draft. JCS co-designed the frame of this publication. DTT, TKA, JGB and JCS also co-supervised enzyme characterization. DH initiated expression in *Pichia pastoris* and edited the manuscript. MY conceived of the study, supervised molecular biology work, participated in sequence alignment and edited the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

#### **Additional material**

##### **Additional file 1**

Complete amino acid sequence of *A. niger* BK01 mannan endo-1,4-*β*-mannosidase including native signal peptide. Amino acid sequence in FASTA format of the entire mannan endo-1,4-*β*-mannosidase from *Aspergillus niger* BK01, including putative signal peptide.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1475-2859-8-59-S1.pdf>]

#### **Acknowledgements**

This work was supported by the National Research Council of Thailand (NRCT), Faculty and Student Exchange Program between Thailand and Neighbour Countries 2007, T2008-219 project (Hanoi University of Technology), Regional Center of Excellence Project (PER) (Agency for French Speaking Universities) and the ASEAN University Network Program

(AUNP). The authors would like to thank Prof. Truong Nam Hai and Dr. Do Thi Huyen (Vietnam Academy of Science and Technology) for valuable advices on the expression studies; MSc. V.T.K. Thoa for technical assistance; and MY lab members for their friendship and technical advices.

## References

- Dhawan S, Kaur J: **Microbial mannanases: an overview of production and applications.** *Crit Rev Biotechnol* 2007, **27**(4):197-216.
- Gübitz G, Sachslehner A, Haltrich D: **Microbial mannanases: substrates, production and application.** In *Glycosyl Hydrolases for Biomass Conversion Volume 769*. Washington, DC: ACS Symposium Series, American Chemical Society; 2001:239-262.
- Schroder R, Atkinson RG, Redgwell RJ: **Re-interpreting the role of endo- $\beta$ -mannanases as mannan endotransglycosylase/hydrolases in the plant cell wall.** *Ann Bot (Lond)* 2009, **104**(2):197-204.
- Turner P, Mamo G, Karlsson EN: **Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining.** *Microb Cell Fact* 2007, **6**:9.
- Viikari L, Alapuranen M, Puranen T, Vehmaanpera J, Siika-Aho M: **Thermostable enzymes in lignocellulose hydrolysis.** *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2007, **108**:121-145.
- Puchart V, Vrsanská M, Svoboda P, Pohl J, Ogel ZB, Biely P: **Purification and characterization of two forms of endo- $\beta$ -1,4-mannanase from a thermotolerant fungus, *Aspergillus fumigatus* IMI 385708 (formerly *Thermomyces lanuginosus* IMI 158749).** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 2004, **1674**(3):239-250.
- Duffaud GD, McCutchen CM, Leduc P, Parker KN, Kelly RM: **Purification and characterization of extremely thermostable beta-mannanase, beta-mannosidase, and alpha-galactosidase from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga neapolitana* 5068.** *Appl Environ Microbiol* 1997, **63**(1):169-177.
- Sachslehner A, Foidl G, Foidl N, Gübitz G, Haltrich D: **Hydrolysis of isolated coffee mannan and coffee extract by mannanases of *Sclerotium roffsii*.** *J Biotechnol* 2000, **80**(2):127-134.
- Sanchez C: **Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi.** *Biotechnol Adv* 2009, **27**(2):185-194.
- Jiang Z, Wei Y, Li D, Li L, Chai P, Kusakabe I: **High-level production, purification and characterization of a thermostable  $\beta$ -mannanase from the newly isolated *Bacillus subtilis* WY34.** *Carbohydrate Polymers* 2006, **66**(1):88-96.
- Luthi E, Jasmat NB, Grayling RA, Love DR, Bergquist PL: **Cloning, sequence analysis, and expression in *Escherichia coli* of a gene coding for a beta-mannanase from the extremely thermophilic bacterium "*Caldocellum saccharolyticum*".** *Appl Environ Microbiol* 1991, **57**(3):694-700.
- Talbot G, Sygusch J: **Purification and characterization of thermostable beta-mannanase and alpha-galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*.** *Appl Environ Microbiol* 1990, **56**(11):3505-3510.
- Hilge M, Gloor SM, Rypniewski W, Sauer O, Heightman TD, Zimmermann W, Winterhalter K, Piontek K: **High-resolution native and complex structures of thermostable beta-mannanase from *Thermomonospora fusca* - substrate specificity in glycosyl hydrolase family 5.** *Structure* 1998, **6**(11):1433-1444.
- Kote NV, Patil AG, Mulimani VH: **Optimization of the production of thermostable endo-beta-1,4 mannanases from a newly isolated *Aspergillus niger* gr and *Aspergillus flavus* gr.** *Appl Biochem Biotechnol* 2009, **152**(2):213-223.
- Luo H, Wang Y, Wang H, Yang J, Yang Y, Huang H, Yang P, Bai Y, Shi P, Fan Y, et al: **A novel highly acidic beta-mannanase from the acidophilic fungus *Bispora* sp. MEY-1: gene cloning and over-expression in *Pichia pastoris*.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2009, **82**(3):453-461.
- Politz O, Krah M, Thomsen KK, Borriss R: **A highly thermostable endo-(1,4)-beta-mannanase from the marine bacterium *Rhodothermus marinus*.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2000, **53**(6):715-721.
- Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B: **The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics.** *Nucleic Acids Res* 2009;D233-238.
- Ethier N, Talbot G, Sygusch J: **Gene cloning, DNA sequencing, and expression of thermostable beta-mannanase from *Bacillus stearothermophilus*.** *Appl Environ Microbiol* 1998, **64**(11):4428-4432.
- Aparicio R, Fischer H, Scott DJ, Verschuere KH, Kulminkaya AA, Eneiskaya EV, Neustroev KN, Craievich AF, Golubev AM, Polikarpov I: **Structural insights into the beta-mannosidase from *T. reesei* obtained by synchrotron small-angle X-ray solution scattering enhanced by X-ray crystallography.** *Biochemistry* 2002, **41**(30):9370-9375.
- Bourgault R, Oakley AJ, Bewley JD, Wilce MC: **Three-dimensional structure of (1,4)-beta-D-mannan mannanohydrolase from tomato fruit.** *Protein Sci* 2005, **14**(5):1233-1241.
- Thu DT, Cuong DB: **Purification and characterization of an endo- $\beta$ -1,4-mannanase from *Aspergillus* sp. BK.** *Journal of Science and Technology (Vietnamese)* 2004, **42**(5):38-43.
- Cregg JM, ed: ***Pichia* Protocols.** 2nd edition. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2007.
- Sabini E, Schubert H, Murshudov G, Wilson KS, Siika-Aho M, Penttilä M: **The three-dimensional structure of a *Trichoderma reesei* beta-mannanase from glycoside hydrolase family 5.** *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2000, **56**(Pt 1):3-13.
- Ademark P, Varga A, Medve J, Harjunpaa V, Torbjorn D, Tjerneld F, Stalbrand H: **Softwood hemicellulose-degrading enzymes from *Aspergillus niger*: Purification and properties of a  $\beta$ -mannanase.** *Journal of Biotechnology* 1998, **63**(3):199-210.
- Araujo A, Ward P: **Hemicellulases of *Bacillus* species: preliminary comparative studies on production and properties of mannanase and galactanases.** *Journal of Applied Bacteriology* 1990, **68**:253-261.
- Chen X, Cao Y, Ding Y, Lu W, Li D: **Cloning, functional expression and characterization of *Aspergillus sulphureus* beta-mannanase in *Pichia pastoris*.** *J Biotechnol* 2007, **128**(3):452-461.
- Duruksu G, Ozturk B, Biely P, Bakir U, Ogel ZB: **Cloning, expression and characterization of endo-beta-1,4-mannanase from *Aspergillus fumigatus* in *Aspergillus sojae* and *Pichia pastoris*.** *Biotechnol Prog* 2009, **25**(1):271-276.
- Setati ME, Ademark P, van Zyl WH, Hahn-Hagerdal B, Stalbrand H: **Expression of the *Aspergillus aculeatus* endo-beta-1,4-mannanase encoding gene (man1) in *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of the recombinant enzyme.** *Protein Expr Purif* 2001, **21**(1):105-114.
- Stalbrand H, Saloheimo A, Vehmaanpera J, Henrissat B, Penttilä M: **Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a *Trichoderma reesei* beta-mannanase gene containing a cellulose binding domain.** *Appl Environ Microbiol* 1995, **61**(3):1090-1097.
- van Zyl PJ, Moodley V, Rose SH, Roth RL, van Zyl WH: **Production of the *Aspergillus aculeatus* endo-1,4-beta-mannanase in *A. niger*.** *J Ind Microbiol Biotechnol* 2009, **36**(4):611-617.
- Roth R, Moodley V, van Zyl P: **Heterologous Expression and Optimized Production of an *Aspergillus aculeatus* Endo-1,4- $\beta$ -mannanase in *Yarrowia lipolytica*.** *Molecular Biotechnology* 2009, **43**(2):112-120.
- Haglund P, Eriksson T, Collen A, Nerincx W, Claeysens M, Stalbrand H: **A cellulose-binding module of the *Trichoderma reesei* beta-mannanase Man5A increases the mannan-hydrolysis of complex substrates.** *J Biotechnol* 2003, **101**(1):37-48.
- Gasser B, Saloheimo M, Rinas U, Dragosits M, Rodriguez-Carmona E, Baumann K, Giuliani M, Parrilli E, Branduardi P, Lang C, et al: **Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview.** *Microb Cell Fact* 2008, **7**:11.
- He X, Liu N, Li W, Zhang Z, Zhang B, Ma Y: **Inducible and constitutive expression of a novel thermostable alkaline  $\beta$ -mannanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5 in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme.** *Enzyme and Microbial Technology* 2008, **43**(1):13-18.
- Arisan-Atac I, Hodits R, Kristufek D, Kubicek CP: **Purification, and characterization of a  $\beta$ -mannanase of *Trichoderma reesei* C-30.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 1993, **39**(1):58-62.
- Araujo A, Ward OP: **Extracellular mannanases and galactanases from selected fungi.** *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 1990, **6**(3):171-178.
- Sachslehner A, Haltrich D: **Purification and some properties of a thermostable acidic endo-beta-1,4-d-mannanase from *Sclerotium (Athelia) roffsii*.** *FEMS Microbiology Letters* 1999, **177**(1):47-55.

38. Yamabhai M, Emrat S, Sukasem S, Pesatcha P, Jaruseranee N, Buranabanyat B: **Secretion of recombinant *Bacillus* hydrolytic enzymes using *Escherichia coli* expression systems.** *Journal of Biotechnology* 2008, **133**(1):50-57.
39. Miller GL: **Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar.** *Analytical Chemistry* 1959, **31**(3):426-428.
40. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, et al: **Clustal W and Clustal X version 2.0.** *Bioinformatics* 2007, **23**(21):2947-2948.
41. Gouet P, Courcelle E, Stuart DI, Metz F: **ESPrpt: analysis of multiple sequence alignments in PostScript.** *Bioinformatics* 1999, **15**(4):305-308.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

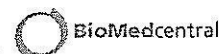
*"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."*

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:  
[http://www.biomedcentral.com/info/publishing\\_adv.asp](http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp)



### ๓.๒ ผลการวิจัย เกี่ยวกับเอนไซม์ mannanase จากเชื้อ *Bacillus licheniformis*

รายงานผลงานนี้นำเสนอในรูปแบบรายงานการตีพิมพ์ในวารสาร Microbial Cell Factories ซึ่งเป็นวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติที่มีต้องผ่านการกลั่นกรองโดยผู้ทรงคุณวุฒิ มีค่า impact factor โดย ISI = 3.34 คือ ซึ่งข้าพเจ้าเป็นผู้เขียนหลัก (corresponding author)

Songsiriritthigul, C.; Buranabanyat, B.; Haltrich, D.; Yamabhai, M., Efficient recombinant expression and secretion of a thermostable GH26 mannan endo-1,4-beta-mannosidase from *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli*. Microb Cell Fact 2010, 9, (1), 20.

ผู้ที่ลงมือทำงานวิจัยนี้คือ นางสาวสุภาพ เอ็มรัตน์ นักวิทยาศาสตร์ช่วยวิจัย นายบัญชา บูรณบุญญิตี นักศึกษาระดับปริญญาโท และ ดร. ชมภูษ สงศิริฤทธิกุล นักวิจัยหลังปริญญาเอก เป็นงานวิจัยศึกษาเอนไซม์ mannanase ที่สกัดได้มาจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* DSM 13 และ DSM 8785 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรมหลายชนิด แต่ยังไม่เคยมีการศึกษาเอนไซม์ mannanase จากเชื้อนี้มาก่อน งานวิจัยเริ่มต้นตั้งแต่การ ตรวจว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง ๒ สามารถผลิตเอนไซม์ mannanase ได้ จากนั้น ทำการโคลนยีน mannanase ด้วยวิธีการ PCR แล้วย้ายยีนที่ได้ไปโคลนเข้าไปในพลาสมิดสำหรับการแสดงออกโดย *Escherichia coli* expression system จากนั้นทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ และการทำให้บริสุทธิ์ แล้วจึงนำเอนไซม์ที่บริสุทธิ์แล้วไปวิเคราะห์หาคุณสมบัติต่างๆ ผลการวิเคราะห์พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ได้จำนวนมาก เอนไซม์มีคุณสมบัติทนความร้อน และทนความเป็น กรดต่าง ดี เหมาะกับการนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรม ดังรายละเอียดในผลงานตีพิมพ์ที่ปรากฏในหน้าต่อไป



RESEARCH

Open Access

# Efficient recombinant expression and secretion of a thermostable GH26 mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase from *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli*

Chomphunuch Songsiriritthigul<sup>†1</sup>, Bancha Buranabanyat<sup>†2</sup>, Dietmar Haltrich<sup>3</sup> and Montarop Yamabhai<sup>\*2</sup>

## Abstract

**Background:** Mannans are one of the key polymers in hemicellulose, a major component of lignocellulose. The Mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase or 1,4- $\beta$ -D-mannanase (EC 3.2.1.78), commonly named  $\beta$ -mannanase, is an enzyme that can catalyze random hydrolysis of  $\beta$ -1,4-mannosidic linkages in the main chain of mannans, glucomannans and galactomannans. The enzyme has found a number of applications in different industries, including food, feed, pharmaceutical, pulp/paper industries, as well as gas well stimulation and pretreatment of lignocellulosic biomass for the production of second generation biofuel. *Bacillus licheniformis* is a Gram-positive endospore-forming microorganism that is generally non-pathogenic and has been used extensively for large-scale industrial production of various enzymes; however, there has been no previous report on the cloning and expression of mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase gene (*manB*) from *B. licheniformis*.

**Results:** The mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase gene (*manB*), commonly known as  $\beta$ -mannanase, from *Bacillus licheniformis* strain DSM13 was cloned and overexpressed in *Escherichia coli*. The enzyme can be harvested from the cell lysate, periplasmic extract, or culture supernatant when using the pFLAG expression system. A total activity of approximately 50,000 units could be obtained from 1-l shake flask cultures. The recombinant enzyme was 6  $\times$  His-tagged at its C-terminus, and could be purified by one-step immobilized metal affinity chromatography (IMAC) to apparent homogeneity. The specific activity of the purified enzyme when using locust bean gum as substrate was 1672  $\pm$  96 units/mg. The optimal pH of the enzyme was between pH 6.0 - 7.0; whereas the optimal temperature was at 50 - 60°C. The recombinant  $\beta$ -mannanase was stable within pH 5 - 12 after incubation for 30 min at 50°C, and within pH 6 - 9 after incubation at 50°C for 24 h. The enzyme was stable at temperatures up to 50°C with a half-life time of activity ( $\tau_{1/2}$ ) of approximately 80 h at 50°C and pH 6.0. Analysis of hydrolytic products by thin layer chromatography revealed that the main products from the bioconversion of locust bean gum and mannan were various manno-oligosaccharide products (M2 - M6) and mannose.

**Conclusion:** Our study demonstrates an efficient expression and secretion system for the production of a relatively thermo- and alkali-stable recombinant  $\beta$ -mannanase from *B. licheniformis* strain DSM13, suitable for various biotechnological applications.

## Background

The Mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase or 1,4- $\beta$ -D-mannanase (EC 3.2.1.78), commonly named  $\beta$ -mannanase, is

an enzyme that can catalyze random hydrolysis of  $\beta$ -1,4-mannosidic linkages in the main chain of  $\beta$ -1,4-mannans, glucomannans and galactomannans; thus it transforms the abundant heteromannans to manno-oligosaccharides [1,2] and a small amount of mannose, glucose and galactose [3]. Mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidases are produced by a number of plants, bacteria, fungi, and by various

\* Correspondence: montarop@sut.ac.th

<sup>2</sup> School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, 111 University Avenue, Nakhon Ratchasima, Thailand

<sup>†</sup> Contributed equally

Full list of author information is available at the end of the article



invertebrates. The enzyme has found a number of applications in different sectors [4], including food, feed, pharmaceutical, and pulp/paper industries, gas well stimulation [1], as well as pre-treatment of lignocellulosic biomass for the production of second generation biofuel [2]. The application of mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase for the production of prebiotic manno-oligosaccharides from cheap agricultural by-products such as copra has recently gained significant interests [5-8].

*Bacillus licheniformis* is a Gram-positive endospore-forming microorganism that belongs to the *B. subtilis* group of the genus *Bacillus*. It is generally non-pathogenic and has been used extensively for large-scale industrial production of exoenzymes such as subtilisins or amylase, and the antibiotic bacitracin [9]. Recently, the genome of *B. licheniformis* strain DSM13 has been reported and it was revealed that it contains many new genes of potential interest for biotechnological applications [10]. So far, there has been no previous report on the cloning and expression of mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase gene (*manB*) from *B. licheniformis*; however, there were some preliminary reports on the property of native enzymes [11,12]. In this work *manB* from *B. licheniformis* strain DSM13, which has been used extensively in industry, was cloned and overexpressed using an *Escherichia coli* expression system [13]. The recombinant enzyme was highly expressed and efficiently secreted into the periplasmic space and subsequently into the culture medium. Amino acid sequence analysis revealed that the enzyme belongs to the glycosyl hydrolase family GH26 [14]. The properties of the recombinant enzyme are also reported, and our results demonstrate that recombinant mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase from *B. licheniformis* is thermo- and alkali-stable, and thus suitable for various industrial applications.

## Results

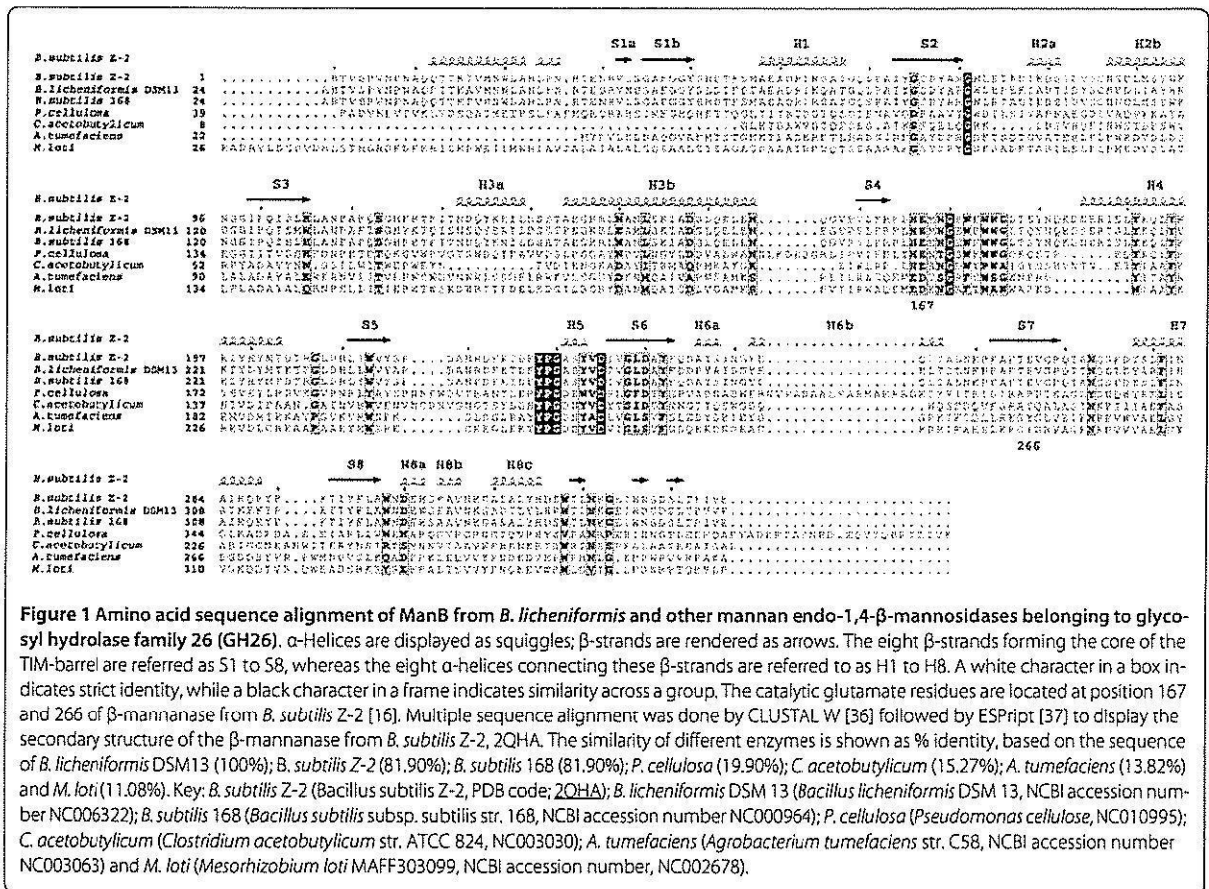
### Cloning and expression of mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase from *Bacillus licheniformis*

The oligonucleotide primers for cloning of the *manB* gene encoding mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase from *B. licheniformis* DSM13 were designed from its complete genomic database, according to the DNA sequence of gene *ydhT* (NCBI accession number NC006322), encoding a hypothetical protein similar to mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase. The gene was cloned into the pFLAG expression vector such that the hypothetical native signal peptide was replaced with the *E. coli* OmpA signal peptide included in this vector. This allows the secretion of the recombinant enzyme into the periplasmic space and subsequently into culture broth. In addition, the DNA sequence encoding a hexahistidine together with a stop codon was incorporated into the reverse primers to create a His-tagged fusion enzyme to facilitate further puri-

fication. The *manB* gene was under control of the *tac* promoter and could be induced for high expression using Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Amino acid sequence analysis revealed that the mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase from *B. licheniformis* has a theoretical molecular mass of 41 kDa, and belongs to glycosyl hydrolase family GH26, according to the CAZy (CARbohydrate-Active EnZymes) databank [15]. This family is a member of clan Glyco hydro tim or TIM barrel glycosyl hydrolase (GH) superfamily, which comprises 26 members, including  $\alpha$ -amylase and cellulase. The deduced amino acid sequence alignment of *B. licheniformis* mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase with other bacterial  $\beta$ -mannanases from family 26 is shown in Fig. 1. The enzyme shows the classical TIM ( $\beta/\alpha$ )8-barrel architecture. The catalytic domains of GH26 members are located at the C-terminus, and conserved amino acid residues of this glycosyl hydrolase family are also shown in Fig. 1. The mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase from *B. licheniformis* is highly similar to ManB from *B. subtilis* Z-2 [16] and *B. subtilis* strain 168 [17] with 82% identity, whereas its similarity to GH26  $\beta$ -mannanases from other bacterial species is significantly less (11-20% identity).

### Expression and secretion of mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase

The recombinant mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase produced in this study was fused with the *E. coli* OmpA signal peptide and thereby could be efficiently secreted into the periplasmic space and culture medium as has been previously reported for this expression system and various secreted *Bacillus*-derived enzymes [13]. Both the efficient expression and extracellular location after induction with IPTG are evident from Fig. 2. At 4 h after induction, a large fraction of the recombinant enzyme was accumulated in the periplasmic space, and after inducing overnight, more enzymes could be found in the culture medium than in the periplasmic space. Comparison of the yield of recombinant *B. licheniformis* mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase in different compartments at various induction conditions in shake flask is given in Table 1. The highest specific activity could be obtained from periplasmic extract after induction with 0.5 mM IPTG overnight, whereas the largest total activity could be obtained from the three fractions after induction with 1 mM IPTG for 4 h. Nevertheless, other conditions yield only slightly different results. Routinely, we obtained 45 - 50,000 U of total mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase activity from a 1-l shake flask culture. To prepare the enzyme for purification and analysis in the next step, we preferred to use the cytoplasmic and especially the periplasmic extract, as the enzyme was highly concentrated, facilitating the subsequent affinity purification step.



### Enzyme purification and assay

The crude enzyme from the periplasmic extract was used for affinity purification on Ni-NTA agarose. The enzyme could be purified to apparent homogeneity using this one-step purification protocol as shown by SDS-PAGE analysis (Fig. 3, panel A). Mannan endo-1,4-β-mannosidase activity of the purified enzyme was shown by in-gel activity staining (Fig. 3, panel B) as well as by the standard β-mannanase assay. Recombinant ManB showed a molecular mass of approximately 45 kDa on SDS-PAGE, confirming the theoretical mass of 41 kDa. The specific activity of the homogenous enzyme was  $1672 \pm 96$  U/mg under the standard assay conditions. We routinely obtained a total of approximately 40,000 U of purified enzyme (equivalent to < 25 mg) from 1-l cultures.

### Effect of pH and temperature

The optimal pH of mannan endo-1,4-β-mannosidase activity from *B. licheniformis* was at pH 6.0 - 7.0 (Fig. 4, panel A). Notably, the enzyme shows a significant activity up to pH 9.0, and is more active at this pH when using glycine buffer than potassium phosphate buffer. The enzyme was stable within pH 5 - 12 after incubation for 30 min at 50°C (Fig. 4, panel B), and within pH 6 - 9 after

incubation at 50°C for 24 h (Fig. 4, panel C). The optimal temperature for ManB activity was 50 - 60°C for the 5-min assay (Fig. 4, panel A). The enzyme was stable up to 55°C after incubation for 30 min at pH 6.0 (Fig. 5, panel B). In addition, it showed a half-life time of activity,  $\tau_{1/2}$  of approximately 80 h at 50°C and pH 6.0, while  $\tau_{1/2}$  decreased considerably to only 3 min at 60°C (Fig. 5C).

### Substrate specificity and kinetic parameters

The relative activity of ManB from *B. licheniformis* for various substrates was determined as shown in Table 2. The enzyme exhibited highest activity on glucomannan prepared from konjac followed by pure 1,4-β-D-mannan and the galactomannan locust bean gum (LBG). The activity of the enzyme with highly substituted galactomannan from guar gum and copra meal was negligible when using the standard assay. However, we found that partial hydrolysis of copra meal after incubation occurred after incubation of this substrate with the enzyme for 2 to 3 days (data not shown).

Furthermore, the kinetic constants for the hydrolysis of selected substrates were determined. Because of the extremely high viscosity of LBG solutions, especially at higher concentrations necessary for the determination of

**Table 1: Yield of recombinant *B. licheniformis* mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase in different cell compartments of *E. coli***

Induction	Culture supernatant		Periplasmic Space		Cytoplasm		Total	
	4 hr	Ovn	4 hr	Ovn	4 hr	Ovn	4 hr	ovn
<b>0.1 mM IPTG</b>								
Total Activity (U/L)	8,659	15,076	13,509	9,983	15,189	24,502	<b>37,357</b>	<b>49,561</b>
Total Protein (mg/L)	147	170	44.5	17.8	186	163	<b>378</b>	<b>351</b>
Sp. Activity (U/L)	58.8	89.0	304	560	81.7	150	<b>99.0</b>	<b>141</b>
<b>0.5 mM IPTG</b>								
Total Activity (U/L)	8,437	14,171	19,649	13,488	10,589	24,480	<b>38,675</b>	<b>52,139</b>
Total Protein (mg/L)	137	156	45.0	20.5	137	199	<b>319</b>	<b>376</b>
Sp. Activity (U/L)	61.7	91.1	437	660	77.3	123	<b>121</b>	<b>139</b>
<b>1.0 mM IPTG</b>								
Total Activity (U/L)	13,561	14,402	17,647	13,232	24,502	26,632	<b>55,710</b>	<b>54,266</b>
Total Protein (mg/L)	153	175	39.5	20.2	163	168	<b>356</b>	<b>363</b>
Sp. Activity (U/L)	88.9	82.4	447	656	150	159	<b>157</b>	<b>149</b>

The typical yield of the overexpression of recombinant mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase from *B. licheniformis* in *E. coli* grown in 1-liter shaken flask cultures is reported. Cells were cultivated and enzymes from various compartments were harvested after induction for 4 and 20 h as described in Material and Method.

the kinetic constants, low-viscosity LBG was prepared by partial hydrolysis [18] and used as a substrate in addition to glucomannan from konjac and pure 1,4- $\beta$ -D-mannan. When present in saturating concentrations, low-viscosity LBG was the preferred substrate as judged both from the highest turnover number  $k_{cat}$  and specificity constant  $k_{cat}/K_m$  (Table 3).

#### Product analysis by thin-layer chromatography

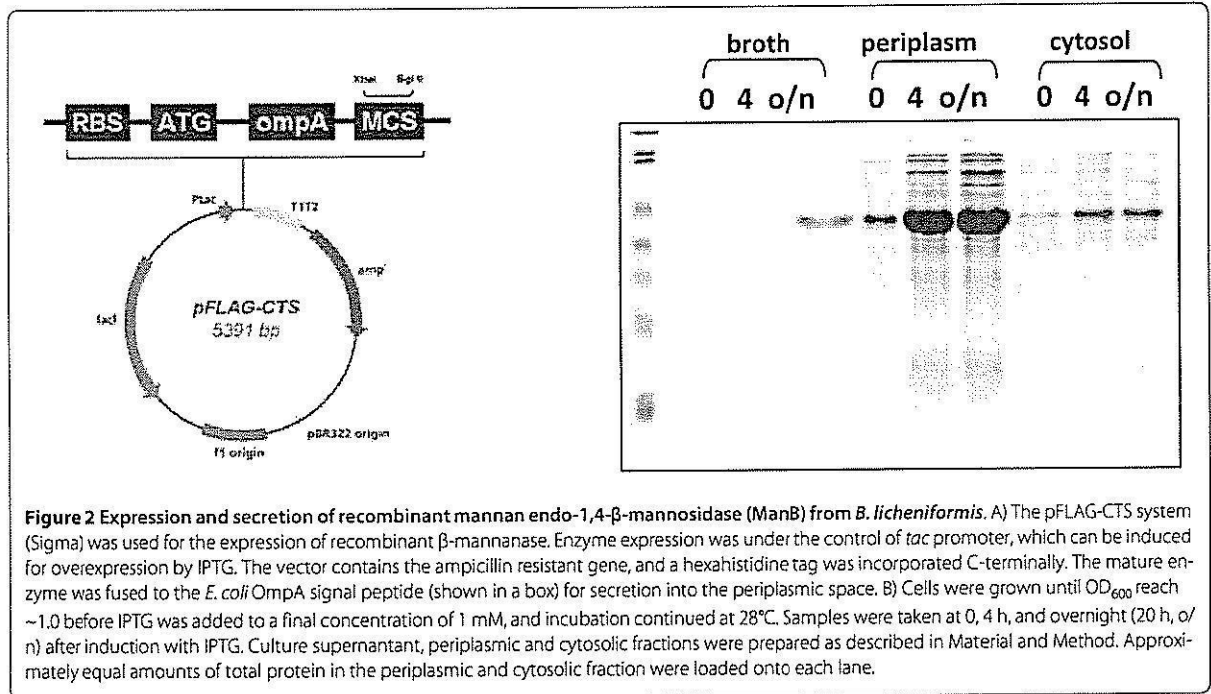
Product analysis by TLC after hydrolysis of various substrates confirmed that the recombinant enzyme is indeed an endo- $\beta$ -mannanase. Various manno-oligosaccharide products (M2 - M6) as well as mannose were found after enzymatic hydrolysis of locust bean gum and mannan (Fig. 6). When mannohexaose (M6) was used as a substrate (Fig. 7), the main products were M2, M3 and M4, suggesting random hydrolysis of this oligosaccharide. After extensive overnight digestion, mannose (M1) could be observed as well. Analysis of hydrolysis products when using different manno-oligosaccharides (M2 - M5) as

substrates revealed that ManB from *B. licheniformis* cannot cleave mannobiose, mannotriose or mannotetraose, whereas mannopentaose was hydrolysed only after extensive incubation overnight, generating M2 and M3 as products (Fig. 7).

#### Discussion

*B. licheniformis* strain DSM13 was used as the source for the isolation of the mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase gene, *manB* since this strain has been used extensively for large-scale production of various industrial enzymes including serine protease (subtilisin) or  $\alpha$ -amylase [9]. The genome of strain DSM13 has recently been sequenced, and a number of new genes of potential biotechnological applications have been identified [10]. The mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase gene was cloned by PCR cloning, using primers designed from the published genome database. This is the first report on the cloning, expression, and characterization of recombinant mannan



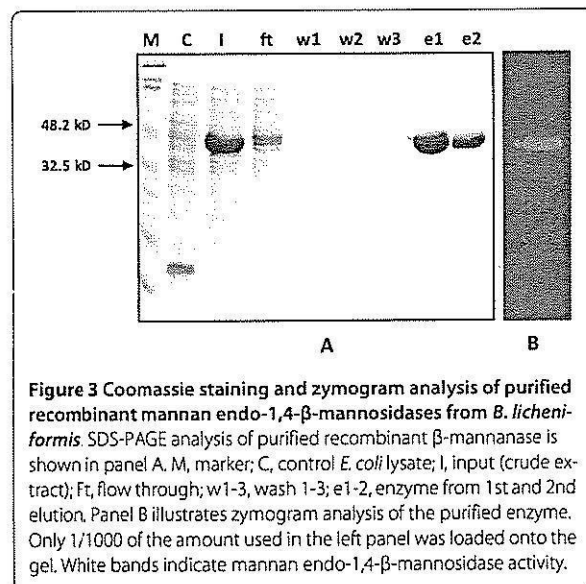


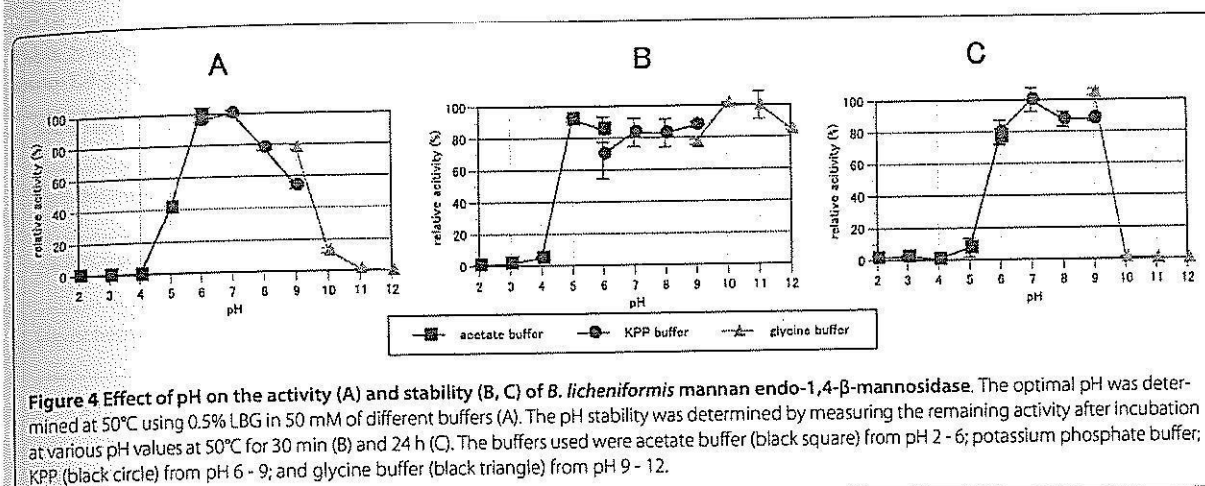
endo-1,4- $\beta$ -mannosidase from *B. licheniformis*. Other reports on recombinant *Bacillus* mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidases were dealing with enzymes from *B. subtilis* [16,19-23], *B. stearothermophilus* [24], and *B. circulans* [25].

Mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidases can be classified into two distinct families, glycosyl hydrolase (GH) family 5 and 26, based on amino acid sequence similarities and hydrophobic cluster analysis [14]. Family GH5 was formerly known as cellulase family A and encompasses

diverse enzymes [26], whereas glycosyl hydrolase family 26 comprises only members with mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase (EC 3.2.1.78) and  $\beta$ -1,3-xylanase (EC 3.2.1.32) activities [14]. Amino acid sequence analysis of mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase from *B. licheniformis* revealed that the enzyme belongs to family GH26. In addition, we also cloned and expressed the mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase gene (*manB*) from *B. licheniformis* strain DSM 8785. The two enzymes have only one amino acid different, and the properties of these two heterologously expressed recombinant enzymes are identical (data not shown).

The expression and production of the recombinant mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase reported here is based on a previously published *E. coli* expression system [13]. The mature mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase gene was fused to the *E. coli* ompA signal sequence and is under the control of *tac* promoter. Thus, the enzyme could be efficiently secreted, and harvested from the culture medium, periplasm, or cell lysate, depending on the culture condition. When the gene was induced for over-expression by 1 mM IPTG for 3 - 4 h, we routinely obtained about 25 mg of recombinant enzyme from the cytoplasmic and periplasmic extracts of 1-liter cultures, which contain more than 40,000 units of purified enzyme. Under the induction with IPTG, a significant fraction of the enzyme was still found in the cytosol. This could indicate that the over-expressed enzyme possibly saturates the bacterial secretion system [27]. It should be mentioned that no optimization aiming at increased



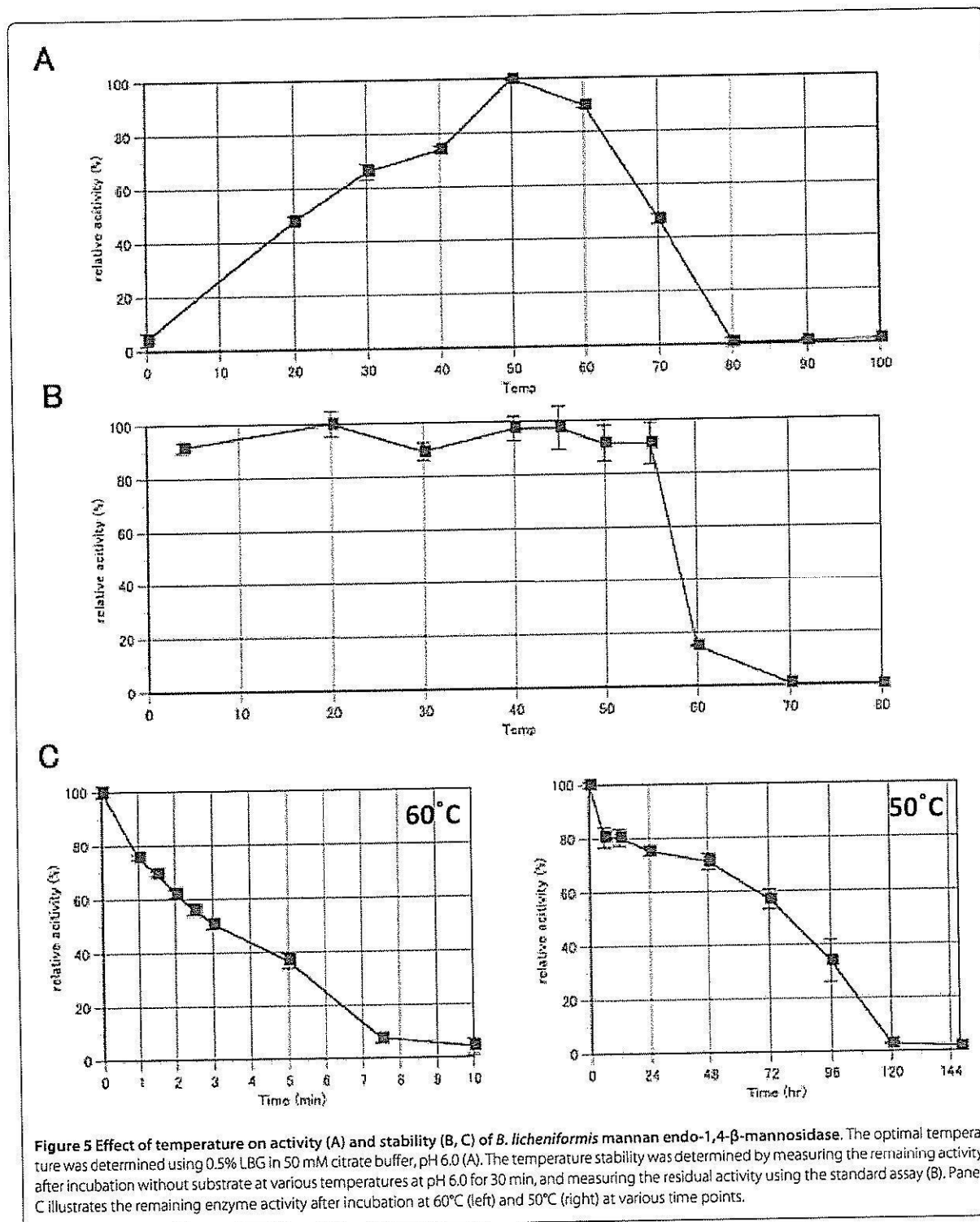


enzyme yields was performed. Thus, by applying optimized culture and induction conditions together with a suitable fermentation strategy, considerably higher recombinant protein yields can be expected. Thus, our expression system is highly efficient for expression of bacterial  $\beta$ -mannosidases and should be applicable for other enzymes as well. More importantly, the extracellular location of the enzyme might be of interest for large-scale cultivations as it circumvents the necessity of cell disruption.

Mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidases are active on various mannans and substituted mannans, but display negligible to low activity towards other plant cell wall polysaccharides [3,28]. The enzymes randomly hydrolyse  $\beta$ -1,4-linkages in diverse substrates such as pure mannans, galactomannans, glucomannans and galactoglucomannans [4]. In this study, we found that *B. licheniformis* ManB shows the highest relative activity for glucomannan prepared from konjac followed by pure low-molecular mass 1,4- $\beta$ -D-mannan of DP (degree of polymerization) < 15 and high-viscosity (high molecular mass) locust bean gum. However, we were not able to detect notable activity for guar gum and copra meal using the standard assay of 5-min incubation. Based on the kinetic characterization and judged from the specificity constant  $k_{cat}/K_m$ , the galactomannan locust bean gum (low viscosity) is the preferred substrate, however the differences in the specificity constant are not very pronounced when compared to konjac glucomannan and pure mannan. Apparently, *B. licheniformis* ManB prefers soluble and low-substituted mannan substrates. This is evident from a comparison of the relative activity on soluble LBG, a galactomannan from *Ceratonia siliqua* with a mannose-to-galactose ratio of 4:1, and soluble guar gum, a galactomannan from *Cymopsis tetragonoloba* with a mannose-to-galactose ratio of 2:1 [1]. While the former is a good substrate, the activity on the latter is negligible

during the 5-min standard assay. Similarly, activity on copra mannan, an insoluble galactomannan with a very low degree of galactosyl substitution, is very low [29].

There have been a number of reports on the characterization of mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidases, both native and recombinant, from various organisms as summarized in Additional file 1. The pH and temperature optima as well as the stability of the enzymes are clearly varying, depending on the sources of the enzymes. Typically, the enzymes from non-bacterial sources show lower pH and temperature optima as well as lesser stability (See Additional file 1). The specific activity (from 3.8-8300 U/mg) and kinetic parameters ( $K_m$  ranging from 0.3-10.2,  $V_{max}$  from 3.8-2000) of the mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidases from various sources, when using LBG as a substrate, vary greatly as shown in Additional file 1. This obviously reflects differences in the structure of the enzymes, for example highly thermostable mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase tend to have lower specific activity compared to their mesophilic counterparts [24,30,31]. In this respect, the *B. licheniformis* ManB described in our report is characterized by a very high specific activity of 1672 U/mg as well as by a relatively high stability. However, when comparing different mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidases it is important to note that locust bean gum, which is a standard substrate for measuring mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase activity, is highly viscous and difficult to prepare. It can be assumed that the large discrepancy of enzyme activity in some of the reports can in part result from various techniques used in substrate preparation. For example we were not able to estimate with confidence the kinetic parameters when using high-viscosity, commercial LBG as a substrate. Thus, only the kinetic parameters when using low-viscosity LBG, low-viscosity glucomannan from konjac, and  $\beta$ -mannan are reported here.



TLC analysis of hydrolysis products confirmed that recombinant *B. licheniformis* mannanase is an endo-mannanase, which can efficiently and randomly cleave higher molecular weight mannans containing more than six

mannose monomers. The enzyme could only cleave mannopentaose after an extended incubation for 12 h and had no detectable activity against mannobiose, -triose or -tetraose. This property suggests that this enzyme

**Table 2: Substrate specificity of *B. licheniformis* mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase**

Substrate	Relative activity (%)
Glucomanan (konjac)	219
1,4- $\beta$ -D-Mannan	166
Locust bean gum	100
Guar gum	nd
Copra meal	nd

The activity of mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase from *B. licheniformis* was determined under standard assay conditions using each substrate at a concentration of 5 g/l. The relative activity with the standard substrate locust bean gum (high viscosity) was defined as 100%.  
 nd: no apparent activity at standard assay condition was detected.

could be applicable for the generation of prebiotic manno-oligosaccharides (MOS), as higher oligosaccharides formed will not be hydrolyzed further. Extensive hydrolysis of cheap and commercial available locust bean gum can therefore result in a mixture of MOS containing various oligosaccharides that may have a diverse prebiotic and anti-obesity [8] effects in different regions of the gut. Higher oligosaccharides are currently discussed as prebiotics with enhanced persistence that can reach more distal regions of the gut, and thus show their positive effect also in that region [32].

### Conclusion

Our results demonstrate an efficient system for expression and secretion of a relatively thermo- and alkali-stable  $\beta$ -mannanase from *B. licheniformis*, which is suitable for industrial applications. In addition, the expression and secretion system that is used in this study could be adopted for production of other enzymes as well.

### Methods

#### Bacterial strains and culture conditions

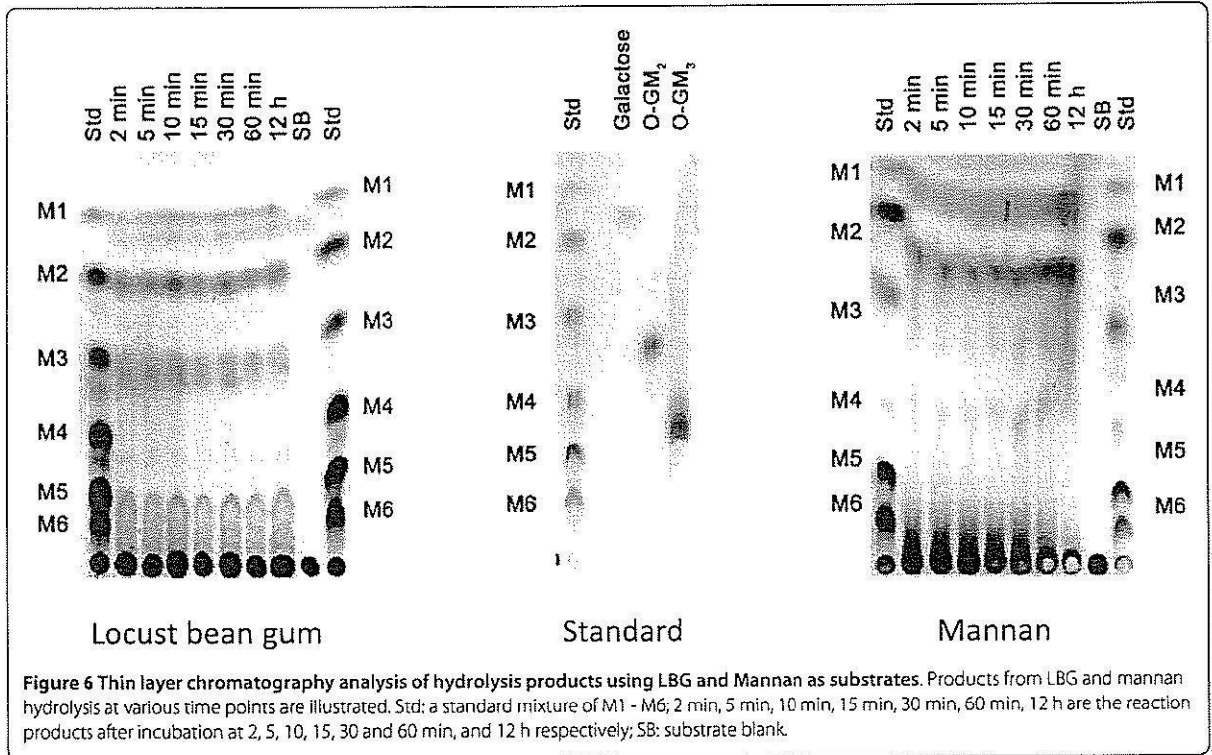
*Bacillus licheniformis* DSM13 (ATCC 14580) was obtained from DSMZ; German Culture Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Braunschweig, Germany). Cells were grown at 37°C and kept in M1 medium. *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Life Technologies) was used in the molecular cloning experiments, whereas *E. coli* Top10 (Invitrogen) was used for expression of the recombinant enzyme. The *E. coli* strains were grown in Luria broth (LB) containing 100  $\mu$ g/ml of ampicillin for maintaining the plasmid.

#### Molecular cloning of mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase from *Bacillus licheniformis*

The gene of the mature mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase was cloned by a PCR-based method. The primers B.liManfwXhoI: CTG TGC CTC GAG CAC ACA CCG TTT CTC CGG TG, and B.liManrv6HiBgl2: CTG TGC AGA TCT TCA ATG GTG ATG GTG ATG GTG TTC CAC GAC AGG CGT CAA AGA ATC GCC were used for PCR amplification of *manB*. These primers were designed using the published sequence from the genomic database of *B. licheniformis* DSM13 (NCBI accession number. NC006322, REGION: 739316740398), and were compatible with the *Xho*I and *Bgl*II cloning sites of pFLAG-CTS expression vectors (Sigma). The DNA encoding native signal peptides were omitted, and the gene of the mature enzyme was fused with the *E. coli* OmpA signal peptide instead in order to enable efficient secretion into the periplasm and culture media. In addition, DNA encoding a hexahistidine tag was incorporated into the reverse primers to generate 6  $\times$  His tagged recombinant enzymes for further purification. PCR reactions were performed according to the recommendations from the manufacture in a thermal cycler from MJ Research. Templates were prepared by boiling a single colony of *B. licheniformis* in 100  $\mu$ l of water for 5 min, and 50  $\mu$ l of that solution were directly used in the PCR reaction. The PCR reaction (total volume of 100  $\mu$ l) consisted of 0.5  $\mu$ M of primers, 0.2 mM dNTP, 3 units of *Pfu* DNA polymerase (Promega), and 10  $\times$  reaction buffer, provided

**Table 3: Kinetic parameters of the purified mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase**

Substrate	Vmax ( $\mu$ mol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )	Km (mg ml <sup>-1</sup> )	kcat (s <sup>-1</sup> )	kcat/Km (mg <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ml)
Glucomanan	30,400	14.9	21,000	1,410
LBG(low viscosity)	45,300	17.5	31,200	1,790
$\beta$ -D-Mannan	26,400	15.2	18,200	1,200

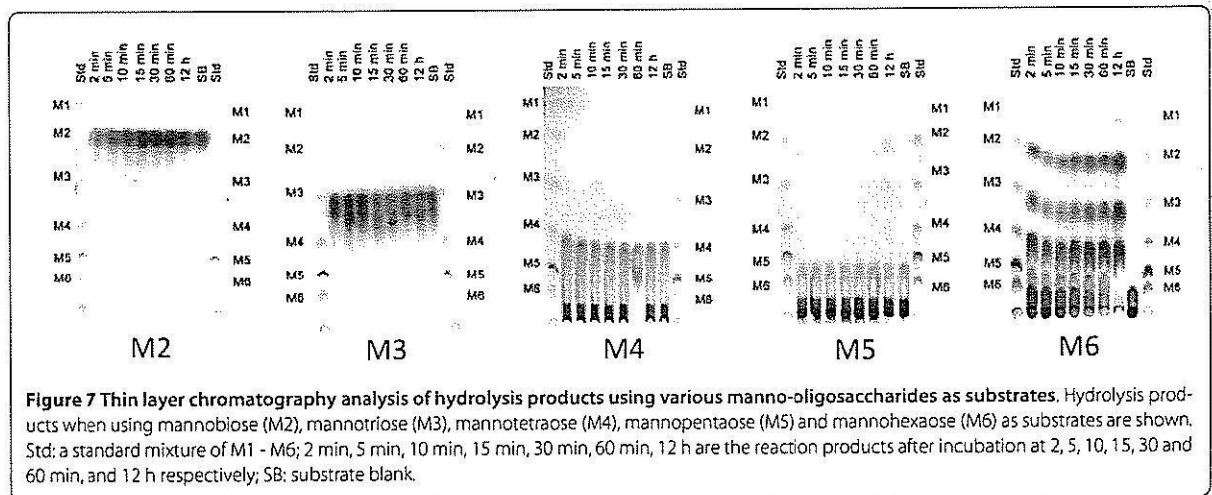


by the manufacturer. The amplifications were done as follows: initial DNA denaturation at 95°C for 2 min; 30 cycles of denaturation at 95°C for 45 sec, annealing at 58°C for 1 min, extension at 72°C for 2.5 min, and a final extension at 72°C for 10 min. The PCR products were separated on 1% agarose gels containing ethidium bromide and visualized under a UV transilluminator. PCR products were purified using PCR purification kits (Qiagen, Germany). The PCR products were then cut with appropriate restriction enzymes (*XhoI* and *BglII*) and

ligated into the pFLAG-CTS expression vector that has been cut with corresponding enzymes. The ligation reactions were transformed into *E. coli* DH5 $\alpha$ . The DNA sequence and the integrity of the constructs were determined by automated DNA sequencing (Macrogen, Korea).

#### Expression of recombinant enzymes

Freshly transformed *E. coli* Top 10 harbouring the recombinant *manB* gene was inoculated into 5 ml of LB broth containing 100  $\mu$ g/ml of ampicillin at 37°C for 16 h. After



that, 1 ml of overnight culture was inoculated into 250-1000 ml of LB broth containing 100 µg/ml ampicillin and grown at 37°C until the optical density at 600 nm reached ~1.0 - 1.5. Then, IPTG was added into the culture broth to a final concentration of 0.1 - 1.0 mM. The culture was subsequently incubated with vigorous shaking (250 rpm) at 26-28°C (room temperature) for 3 - 4 h. The culture was collected and chilled in an icebox for 5 min and centrifuged at 2,000 × g for 10 min at 4°C to separate cells and supernatant. To extract the periplasmic content, the cells were resuspended in 2.5 ml of cold (4°C) spheroplast buffer [100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 mM EDTA, 0.58 M sucrose, and 20 µg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)]. After incubation for 5 min on ice, bacterial cells were collected by centrifugation at 8,000 × g at 4°C for 10 min and re-suspended in 1-2 ml of ice-cold sterile water supplemented with 1 mM MgCl<sub>2</sub> and incubated on ice for 5 minutes with frequent shaking. The supernatant of approximately 1 - 2 ml was then collected by centrifugation at 8,000 × g at 4°C for 15 min as the periplasmic fraction. To extract the cell lysate, the precipitated cells from the previous step were washed once with lysis buffer (50 mM Tris-HCl + 0.5 mM EDTA), resuspended in 1 - 2 ml of lysis buffer, and sonicated (Ultrasonic Processor; 60 amplitude, pulser 6 sec, for 2 min) on ice. The cell debris was then spun down at 8,000 × g and the supernatant was collected as the cell lysate.

#### Purification of recombinant mannan endo-1,4-β-mannosidase

Immobilized metal affinity chromatography (IMAC) was used for purification of 6 × His-tagged recombinant β-mannanase by gravity-flow chromatography, using Ni-NTA Agarose according to the manufacturer protocol (Qiagen). The periplasmic extract was loaded onto a column and washed three times with increasing concentrations of imidazole of 5, 10 and 20 mM. The enzyme was then eluted by elution buffer containing 250 mM imidazole, and dialyzed using a dialysis membrane (Pierce Biotechnology, 10-kDa molecular-weight cutoff) to remove imidazole.

#### Gel electrophoresis and zymogram analysis

Denaturing sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed according to the method of Laemmli [33], in a 12% (w/v) polyacrylamide gel. The protein samples were briefly heated (3 min) in the loading buffer at 100°C using a heat block (Eppendorf). Protein bands were visualized by staining with Coomassie brilliant blue R-250. The molecular weight markers were from Biorad.

A zymogram of mannan endo-1,4-β-mannosidase activities was generated by an in-gel activity assay using 0.25% locust bean gum as substrate, copolymerized with

10% (w/v) polyacrylamide. The enzyme samples were mixed with the loading buffer in the absence of reducing agent, and then applied onto a polyacrylamide gel. After electrophoresis, the gel was soaked in 2.5% Triton X-100 for 30 min at 4°C, and incubated in sodium phosphate buffer pH 7.0 at 50°C for 1 h. The gel was then rinsed with de-mineralized water, stained with 0.1% Congo red solution and gentle shaking for 20 min prior to destaining with 1 M NaCl for 20-30 min, and thereafter was placed in 5% acetic acid for 3 min (optional). Mannan endo-1,4-β-mannosidase activity was detected as clear zones against red (after staining with Congo red) or blue background (after soaking in 5% acetic acid).

#### Protein determination

Protein concentration was determined by the method of Bradford [34] using bovine serum albumin as standard.

#### Enzyme assays

Standard mannan endo-1,4-β-mannosidase activity was assayed using the dinitrosalicylic acid (DNS) method [35]. The substrate, 0.5% locust bean gum (Sigma), was dissolved in 50 mM sodium citrate buffer, pH 6.0 by homogenizing at 80°C, heated to the boiling point, cooled and stored overnight with continuous stirring. After that insoluble was removed by centrifugation. An appropriately diluted enzyme solution (0.1 ml) was incubated with 0.9 ml of the substrate solution at 50°C for exactly 5 min. The amount of reducing sugars liberated in the enzyme reaction was assayed by mixing 100 µl of the enzyme reaction with 100 µl DNS solution, heating at 100°C for 20 min, cooling on ice, and diluting with 300 µl of de-ionized water before measuring the absorbance at 540 nm. One unit of mannan endo-1,4-β-mannosidase activity is defined as the amount of enzyme that liberates 1 µmol of reducing sugar (using D-mannose as a standard) per minute under the experimental conditions given.

#### Effect of pH and temperature on enzyme activity

The optimal pH of mannan endo-1,4-β-mannosidase activity was measured between pH 2.0 - 12.0 under standard assay condition, using three buffer systems (each 50 mM): sodium acetate (pH 2.0 - 6.0), potassium phosphate (pH 6.0 - 9.0), and glycine (pH 9.0 - 12.0). To determine the pH stability of mannan endo-1,4-β-mannosidase, enzyme samples were incubated at various pH values using the same buffer systems as above at 50°C for 30 min or 24 h, and then the remaining enzyme activity was measured under standard assay condition.

The temperature dependence of mannan endo-1,4-β-mannosidase activity was measured by incubating the enzyme samples with the substrate at temperatures ranging from 4 - 100°C in 50 mM citrate buffer pH 6.0. Thermal stability of the enzyme was determined by incubating

enzyme samples in 50 mM citrate buffer, pH 6.0, at various temperatures ranging from 4 - 80°C for 30 min, then the remaining enzyme activity was measured under standard assay condition. In addition, the thermal inactivation kinetics at 50 and 60°C were determined in 50 mM citrate buffer, pH 6.0, by measuring the residual enzyme activity at certain time points assayed under standard condition.

#### Relative activity and kinetic parameters

The relative activity of *B. licheniformis* mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase against konjac glucomannan, 1,4- $\beta$ -D-mannan, locust bean gum, guar gum and copra meal was determined by pre-incubating 5 mg/ml of each substrate in 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 at 50°C for 30 min with constant agitation using a Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). After adding the purified enzyme (276 ng), the reaction was incubated at 50°C with shaking for 5 min, and then terminated by boiling for 10 min. The release of reducing sugars was detected by the DNS method as described above. Relative mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase activities against various substrates were calculated by converting  $A_{540}$  to  $\mu$ moles of mannose released.

For determination of the kinetic parameters, various concentrations of different substrates in 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 [konjac glucomannan, low viscosity (3-19.5 mg/ml); 1,4- $\beta$ -D-mannan (3-30 mg/ml); locust bean gum, low viscosity (3-39 mg/ml)] were incubated with the purified mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase (138 ng) at 50°C for 5 min. The  $V_{max}$  and  $K_m$  values were calculated by non-linear regression analysis, using the GraphPad Prism software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

Mannose, konjac glucomannan (low viscosity) and 1,4- $\beta$ -D-mannan (prepared by controlled hydrolysis of carob galactomannan, DP < 15) were purchased from Megazyme International (Bray, Ireland). Locust bean gum (LBG) was isolated from *Ceratonia siliqua* seeds (Sigma-Aldrich). Low-viscosity locust bean gum was prepared according to a previously published protocol [18]. Guar gum was purchased from Sigma-Aldrich, while copra meal was bought from a local market in Nakhon Ratchasima province, Thailand.

#### Thin-layer chromatography

Hydrolysis of 15 mM substrates (manno-oligosaccharides M2-M6), 0.1 mg LBG (high viscosity) and 0.1 mg of 1,4- $\beta$ -D-mannan by mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase was carried out in a 30- $\mu$ l reaction mixture, containing 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0, and 13.8 ng (for M2 - M6), 276 ng (for LBG) or 2.76  $\mu$ g (for 1,4- $\beta$ -D-mannan) of purified enzyme. The reaction mixture was incubated at 50 °C with shaking for 2, 5, 10, 15, 30, 60 min, and 12 h prior to

termination of the hydrolysis reaction by boiling for 5 min. A sample of each reaction mixture was applied five times (one  $\mu$ l each) to a silica TLC plate (6.0  $\times$  10.0 cm), and then chromatographed twice (2 h each) using a mobile phase containing n-propanol: ethanol: water (7:1:2) (v/v), followed by spraying with 5% sulphuric acid and heating at 180°C for 3 min. A mixture of M1-M6 (5 nmol each) was used as standard. Manno-oligosaccharides (M2-M6), galacto-manno-oligosaccharides (OGM2 and OGM3), mannose and galactose were from Megazyme, and locust bean gum was from Sigma-Aldrich. Silicagel 60 F254 aluminum sheet, n-propanol and ethanol were purchased from Merck (Damstadt, Germany).

#### Additional material

**Additional file 1** Properties of various mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidases; pdf format; A summary of properties of different mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidases, i.e. Source, GH family, pH and temperature optima, yield, stability, specific activity, kinetic parameter using LBG as substrate, and reference [38-50].

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### Authors' contributions

CS performed amino acid sequence analysis, purified and analyzed the enzyme. BB expressed and characterized the enzyme properties. DH supervised enzyme characterization, co-designed experiments, evaluated the data, and edited the manuscript. MY conceived of the study, participated in cloning and expression of the enzymes, and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

#### Acknowledgements

This research was supported by ASEAN-EU University Network Programme (AUNP), National research council of Thailand (NRCT), and Suranaree University of Technology (SUT). We would like to thank Miss Suphap Emrat, Miss Sasithorn Lapboonrueng, and Miss Phakaimas Phitngam for excellent technical assistances.

#### Author Details

<sup>1</sup>Synchrotron Light Research Institute (Public Organization), 111 University Avenue, Nakhon Ratchasima, Thailand, <sup>2</sup>School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, 111 University Avenue, Nakhon Ratchasima, Thailand and <sup>3</sup>BOKU, University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna, Austria

Received: 18 January 2010 Accepted: 11 April 2010

Published: 11 April 2010

#### References

- Gübitz G, Sachslehner A, Haltrich D: Microbial mannanases: substrates, production and application. *Glycosyl Hydrolases for Biomass Conversion: 2001; Washington, DC: ACS Symposium Series, American Chemical Society* 2001, 769:239-262.
- Sanchez C: Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol Adv* 2009, 27(2):185-194.
- Braithwaite KL, Black GW, Hazlewood GP, Ali BR, Gilbert HJ: A non-modular endo-beta-1,4-mannanase from *Pseudomonas fluorescens* subspecies cellulosa. *Biochem J* 1995, 305(Pt 3):1005-1010.
- Dhawan S, Kaur J: Microbial mannanases: an overview of production and applications. *Crit Rev Biotechnol* 2007, 27(4):197-216.
- Biggs P, Parsons CM: The effects of several oligosaccharides on true amino acid digestibility and true metabolizable energy in

- cecetomized and conventional roosters. *Poult Sci* 2007, **86**(6):1161-1165.
6. Gibson GR, McCartney AL, Rastall RA: Prebiotics and resistance to gastrointestinal infections. *Br J Nutr* 2005, **93**(Suppl 1):S31-34.
  7. Rastall RA, Gibson GR, Gill HS, Guarner F, Klaenhammer TR, Pot B, Reid G, Rowland IR, Sanders ME: Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: an overview of enabling science and potential applications. *FEMS Microbiol Ecol* 2005, **52**(2):145-152.
  8. Smith DL Jr, Nagy TR, Wilson LS, Dong S, Barnes S, Allison DB: The Effect of Mannan Oligosaccharide Supplementation on Body Weight Gain and Fat Accrual in C57Bl/6J Mice. *Obesity (Silver Spring)* 2009.
  9. Schallmeyer M, Singh A, Ward OP: Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can J Microbiol* 2004, **50**(1):1-17.
  10. Veith B, Herzberg C, Steckel S, Feesche J, Maurer KH, Ehrenreich P, Baumer S, Henne A, Liesegang H, Merkl R, et al: The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2004, **7**(4):204-211.
  11. Araujo A, Ward P: Hemicellulases of *Bacillus* species: preliminary comparative studies on production and properties of mannanase and galactanases. *Journal of Applied Bacteriology* 1990, **68**:253-261.
  12. Zhang J, He Z, Hu K: Purification and characterization of  $\beta$ -mannanase from *Bacillus licheniformis* for industrial use. *Biotechnology Letters* 2000, **22**(17):1375-1378.
  13. Yamabhai M, Emrat S, Sukasem S, Pesatcha P, Jaruseranee N, Buranabanyat B: Secretion of recombinant *Bacillus* hydrolytic enzymes using *Escherichia coli* expression systems. *Journal of Biotechnology* 2008, **133**(1):50-57.
  14. Henrissat B, Davies G: Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr Opin Struct Biol* 1997, **7**(5):637-644.
  15. Coutinho PM, Henrissat B, (eds.): Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. Cambridge: The Royal Society of Chemistry; 1999.
  16. Yan X-X, An X-M, Gui L-L, Liang D-C: From Structure to Function: Insights into the Catalytic Substrate Specificity and Thermostability Displayed by *Bacillus subtilis* Mannanase BCman. *Journal of Molecular Biology* 2008, **379**(3):535-544.
  17. Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini AM, Alloni G, Azevedo V, Bertero MG, Bessieres P, Bolotin A, Borchert S, et al: The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 1997, **390**(6657):249-256.
  18. Kremnický L, Slaviková E, Mislovicová D, Biely P: Production of extracellular beta-mannanases by yeasts and yeast-like microorganisms. *Folia Microbiol (Praha)* 1996, **41**(1):43-47.
  19. He X, Liu N, Li W, Zhang Z, Zhang B, Ma Y: Inducible and constitutive expression of a novel thermostable alkaline  $\beta$ -mannanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5 in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Enzyme and Microbial Technology* 2008, **43**(1):13-18.
  20. Li YN, Meng K, Wang YR, Yao B: A beta-mannanase from *Bacillus subtilis* B36: purification, properties, sequencing, gene cloning and expression in *Escherichia coli*. *Z Naturforsch [C]* 2006, **61**(11-12):840-846.
  21. Mendoza NS, Arai M, Sugimoto K, Ueda M, Kawaguchi T, Joson LM: Cloning and sequencing of beta-mannanase gene from *Bacillus subtilis* NM-39. *Biochim Biophys Acta* 1995, **1243**(3):552-554.
  22. Yoon KH, Chung S, Lim BL: Characterization of the *Bacillus subtilis* WL-3 mannanase from a recombinant *Escherichia coli*. *J Microbiol (Seoul, Korea)* 2008, **46**(3):344-349.
  23. Zhang Q, Yan X, Zhang L, Tang W: [Cloning, sequence analysis and heterologous expression of a beta-mannanase gene from *Bacillus subtilis* Z-2]. *Mol Biol (Mask)* 2006, **40**(3):418-424.
  24. Ethier N, Talbot G, Sygusch J: Gene cloning, DNA sequencing, and expression of thermostable beta-mannanase from *Bacillus stearothermophilus*. *Appl Environ Microbiol* 1998, **64**(11):4428-4432.
  25. Li Y, Yang P, Meng K, Wang Y, Luo H, Wu N, Fan Y, Yao B: Gene cloning, expression, and characterization of a novel beta-mannanase from *Bacillus circulans* CGMCC 1416. *J Microbiol Biotechnol* 2008, **18**(1):160-166.
  26. Davies G, Henrissat B: Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 1995, **3**(9):853-859.
  27. Simmons LC, Yansura DG: Translational level is a critical factor for the secretion of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* 1996, **14**(5):629-634.
  28. Do BC, Dang TT, Berrin JG, Haltrich D, To KA, Sigoillot JC, Yamabhai M: Cloning, expression in *Pichia pastoris*, and characterization of a thermostable GH5 mannan endo-1,4-beta-mannosidase from *Aspergillus niger* BK01. *Microb Cell Fact* 2009, **8**:59.
  29. Jiang Z, Wei Y, Li D, Li L, Chai P, Kusakabe I: High-level production, purification and characterization of a thermostable  $\beta$ -mannanase from the newly isolated *Bacillus subtilis* WY34. *Carbohydrate Polymers* 2006, **66**(1):88-96.
  30. Duffaud GD, McCutchen CM, Leduc P, Parker KN, Kelly RM: Purification and characterization of extremely thermostable beta-mannanase, beta-mannosidase, and alpha-galactosidase from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga neopolitana* 5068. *Appl Environ Microbiol* 1997, **63**(1):169-177.
  31. Politz O, Krah M, Thomsen KK, Borris R: A highly thermostable endo-(1,4)-beta-mannanase from the marine bacterium *Rhodothermus marinus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2000, **53**(6):715-721.
  32. Rastall RA, Maitin V: Prebiotics and synbiotics: towards the next generation. *Curr Opin Biotechnol* 2002, **13**(5):490-496.
  33. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, **227**(5259):680-685.
  34. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976, **72**:248-254.
  35. Miller GL: Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* 1959, **31**(3):426-428.
  36. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, et al: Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 2007, **23**(21):2947-2948.
  37. Gouet P, Courcelle E, Stuart DI, Metz F: ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* 1999, **15**(4):305-308.
  38. Setati ME, Ademark P, van Zyl WH, Hahn-Hagerdal B, Ståhlbrand H: Expression of the *Aspergillus aculeatus* endo-beta-1,4-mannanase encoding gene (man1) in *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of the recombinant enzyme. *Protein Expr Purif* 2001, **21**(1):105-114.
  39. Puchart V, Vrsanská M, Svoboda P, Pohl J, Ůgel ZB, Biely P: Purification and characterization of two forms of endo- $\beta$ -1,4-mannanase from a thermotolerant fungus, *Aspergillus fumigatus* IMI 385708 (formerly *Thermomyces lanuginosus* IMI 158749). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 2004, **1674**(3):239-250.
  40. Ademark P, Varga A, Medve J, Harjunpaa V, Torbjorn D, Tjerneld F, Ståhlbrand H: Softwood hemicellulose-degrading enzymes from *Aspergillus niger*: Purification and properties of a  $\beta$ -mannanase. *Journal of Biotechnology* 1998, **63**(3):199-210.
  41. Chen X, Cao Y, Ding Y, Lu W, Li D: Cloning, functional expression and characterization of *Aspergillus sulphureus* beta-mannanase in *Pichia pastoris*. *J Biotechnol* 2007, **128**(3):452-461.
  42. Chen X, Lu W, Cao Y, Li D: Prokaryotic Expression, Purification and Characterization of *Aspergillus sulphureus* beta-Mannanase and Site-Directed Mutagenesis of the Catalytic Residues. *Appl Biochem Biotechnol* 2008, **149**(2):139-144.
  43. Talbot G, Sygusch J: Purification and characterization of thermostable beta-mannanase and alpha-galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*. *Appl Environ Microbiol* 1990, **56**(11):3505-3510.
  44. Luthi E, Jasmal NB, Grayling RA, Love DR, Bergquist PL: Cloning, sequence analysis, and expression in *Escherichia coli* of a gene coding for a beta-mannanase from the extremely thermophilic bacterium "*Caldocellum saccharolyticum*". *Appl Environ Microbiol* 1991, **57**(3):694-700.
  45. Xu B, Häggglund P, Ståhlbrand H, Janson J-C: endo- $\beta$ -1,4-Mannanases from blue mussel, *Mytilus edulis*: purification, characterization, and mode of action. *Journal of Biotechnology* 2002, **92**(3):267-277.
  46. Xu B, Sellos D, Janson JC: Cloning and expression in *Pichia pastoris* of a blue mussel (*Mytilus edulis*) beta-mannanase gene. *Eur J Biochem* 2002, **269**(6):1753-1760.
  47. Ståhlbrand H, Saloheimo A, Vehmaanpera J, Henrissat B, Penttilä M: Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a *Trichoderma reesei* beta-mannanase gene containing a cellulose binding domain. *Appl Environ Microbiol* 1995, **61**(3):1090-1097.



48. Stålbrand H, Siika-aho M, Tenkanen M, Viikari L: Purification and characterization of two  $\beta$ -mannanases from *Trichoderma reesei*. *Journal of Biotechnology* 1993, **29**(3):229-242.
49. Wei YH, Mao AJ, He YZ, Qiao Y, Dong ZY: [Expression of endo-beta-mannanase gene from *Trichoderma reesei* in *Pichia pastoris*]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 2005, **21**(6):878-883.
50. Tamaku Y, Akaki T, Morishita T, Kimura T, Sakka K, Ohmiya K: Cloning, DNA sequencing, and expression of the  $\beta$ -1,4-mannanase gene from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain MA-138. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 1997, **83**(2):201-205.

doi: 10.1186/1475-2859-9-20

**Cite this article as:** Songsiriritthigul *et al.*, Efficient recombinant expression and secretion of a thermostable GH26 mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase from *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli* *Microbial Cell Factories* 2010, **9**:20

**Submit your next manuscript to BioMed Central  
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)



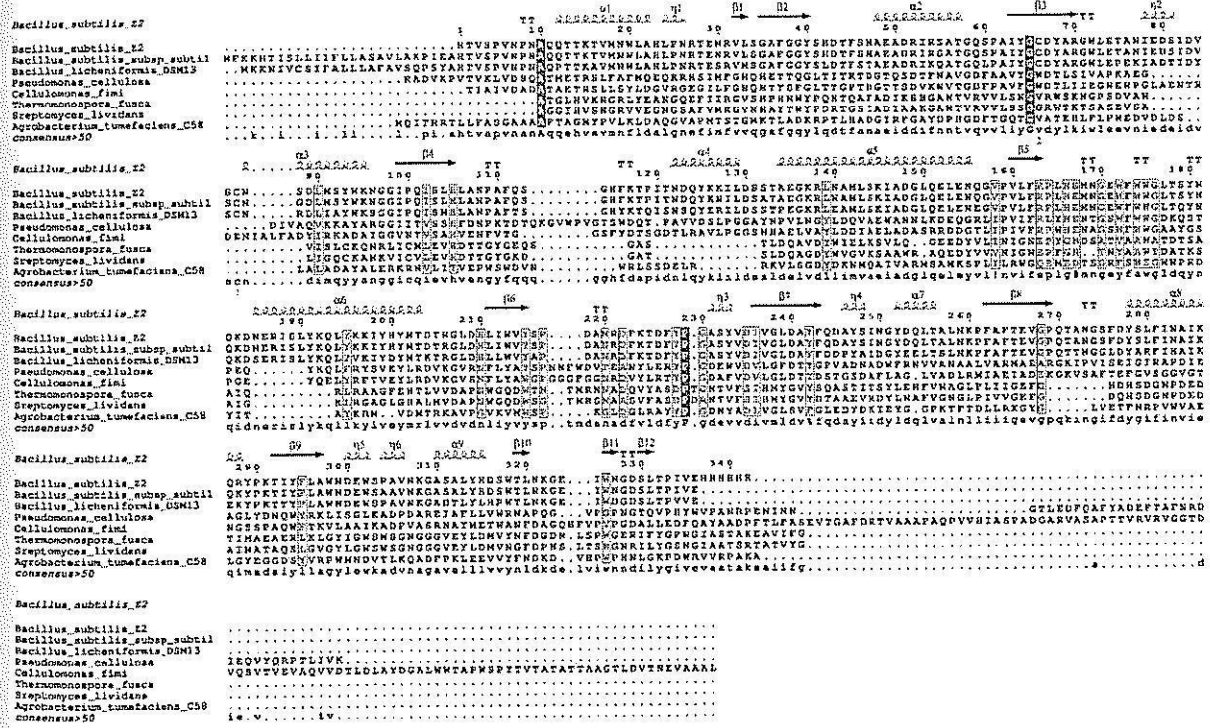
### ๓.๓ ผลการวิจัยอื่นๆ ที่ไม่ได้นำไปตีพิมพ์

นอกจากผลการวิจัยหลัก ๒ เรื่อง ดังที่กล่าวข้างต้น แล้ว ยังมีผลงานวิจัยอื่นๆ ที่ไม่ได้นำไปตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการ เพราะยังมีองค์ความรู้ใหม่ไม่สมบูรณ์เพียงพอต่อการตีพิมพ์ ผลงานตีพิมพ์ดังกล่าวคือ

#### ๓.๓.๑ ผลการวิจัยเกี่ยวกับเอนไซม์ mannanase จากเชื้อ *Bacillus subtilis* 168

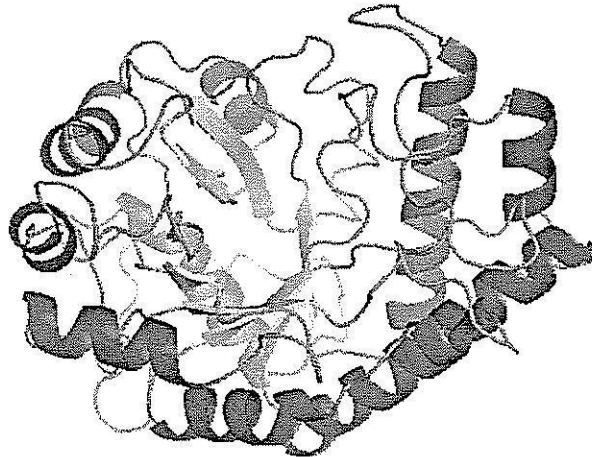
การดำเนินงานวิจัยเรื่องนี้คล้ายคลึงกับงานวิจัยในหัวข้อ ๓.๒ แต่ต่างกันที่แหล่งที่มาของยีนของเอนไซม์ mannanase วิธีการดำเนินการทดลอง ตั้งแต่การโคลนยีน การแสดงออกใน *E. coli* และ การผลิต การทำให้บริสุทธิ์ รวมทั้งการวิเคราะห์คุณสมบัติเหมือนกัน ผลการจากการทดลองวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์ mannanase จากเชื้อ *B. subtilis* 168 พบว่าแตกต่างจากเอนไซม์จากเชื้อ *B. licheniformis* ดังนี้

ลำดับกรดอะมิโน พบว่ามีความเหมือนกันร้อยละ ๘๘ การเทียบเคียงโครงสร้างกับเอนไซม์จากจุลินทรีย์อื่นแสดงถึงภาพด้านล่าง



โครงสร้างปฐมภูมิและทุติยภูมิของเอนไซม์ mannanase จากแบคทีเรียชนิดต่างๆ

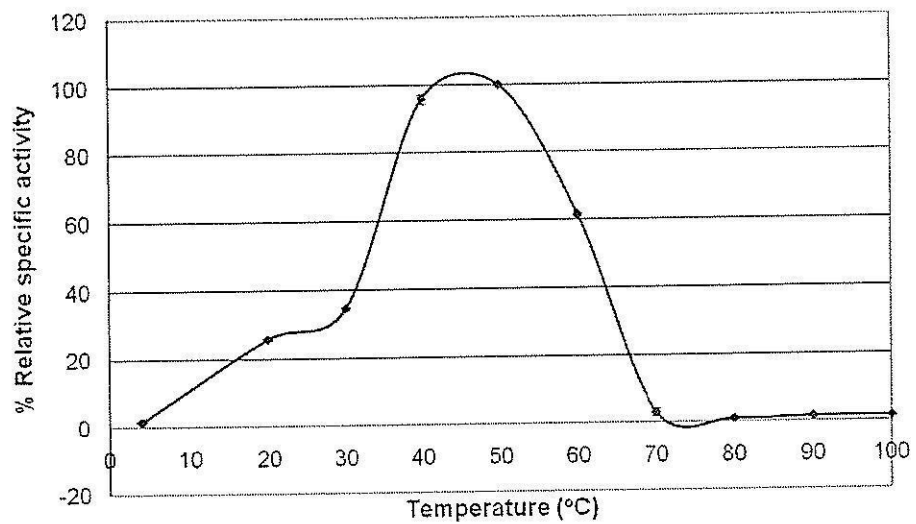
ส่วนโครงสร้างในรูปแบบ ๓ มิติ จากการคำนวณมีโครงสร้างดังแสดงด้านล่าง



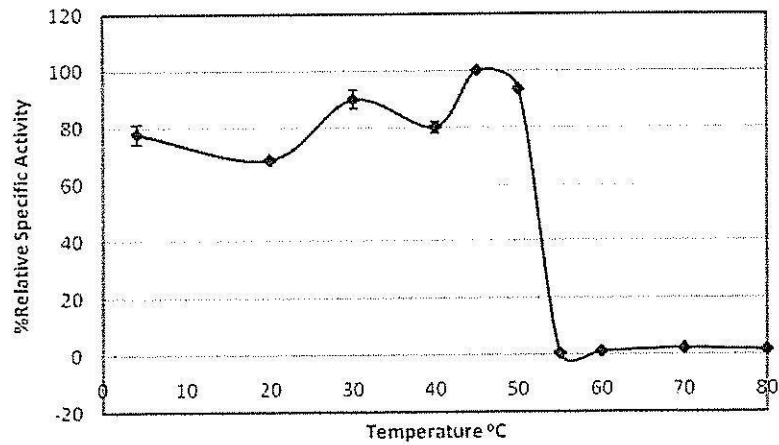
แบบจำลองโครงสร้าง ๓ มิติของเอนไซม์ mannanase จาก *B. subtilis* 168

ผลของอุณหภูมิต่อความสามารถในการมีกิจกรรมของเอนไซม์แสดงได้ดังภาพด้านล่าง

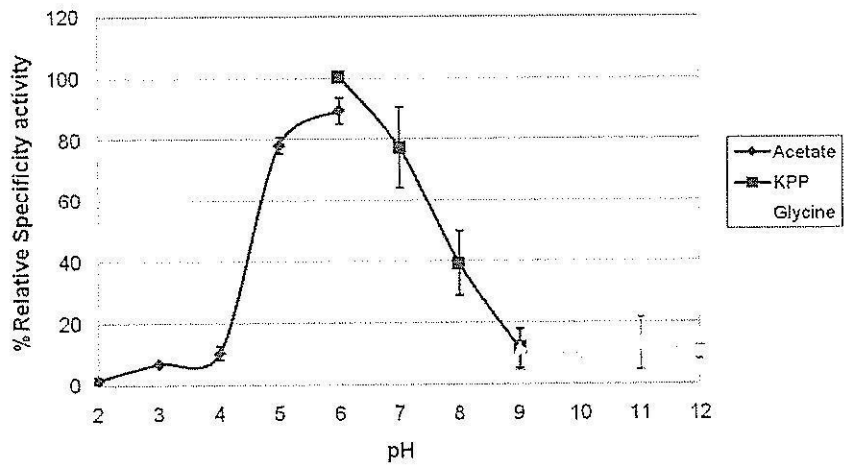
ก) ภาพแสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำกิจกรรมของเอนไซม์



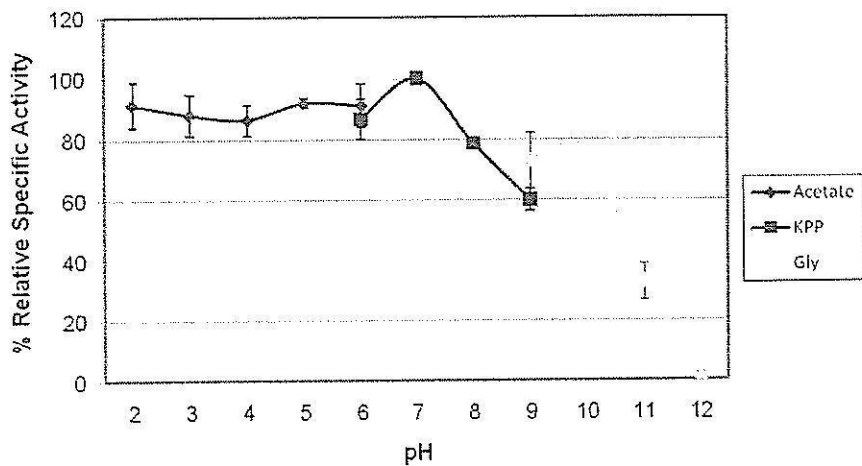
ข) ความทนทานของเอนไซม์หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆเป็นเวลา ๓๐ นาที



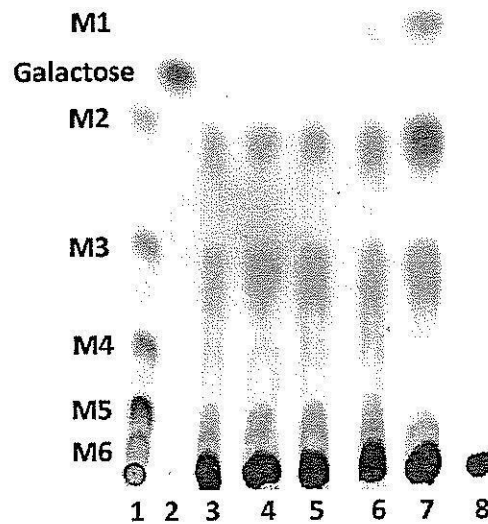
ค) ภาพแสดงค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในการทำกิจกรรมของเอนไซม์



ง) ความทนทานของเอนไซม์หลังจากเก็บไว้ที่ความเป็นกรดต่างค่าต่างๆ เป็นเวลา ๓๐ นาที



จ) ผลผลิตจากการย่อย Mannan ด้วยวิธีการ TLC



ข) ตารางความสามารถในการมีกิจกรรมของเอนไซม์เมื่อเทียบกับ mannanase จากเชื้อ *B. licheniformis*

Substrate	Relative activity (%)	
	pETManBsub	pFManBli13
Glucomannan (Konjac)	128	219
1,4-b-D-Mannan	295	166
Locust bean gum	100	100
Guar gum	nd	nd
Copra meal	nd	nd

ข) ตารางแสดงค่าทางพลจลศาสตร์ของเอนไซม์เมื่อเทียบกับ mannanase จากเชื้อ *B. licheniformis*

Kinetics		Substrate		
		Glucomannan	LBG low viscosity	$\beta$ -D-mannan
<b>V<sub>max</sub></b> ( $\mu\text{molmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$ )	pETManBsub	17,000	45,000	14,600
	pFManBli13	30,400	45,300	26,400
<b>K<sub>m</sub></b> ( $\text{mgml}^{-1}$ )	pETManBsub	5.3	18.1	11.8
	pFManBli13	14.9	17.5	15.2
<b>k<sub>cat</sub></b> ( $\text{s}^{-1}$ )	pETManBsub	12,400	32,700	10,600
	pFManBli13	21,000	31,200	18,200
<b>k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub></b> ( $\text{mg}^{-1}\text{s}^{-1}\text{ml}$ )	pETManBsub	2,400	1,800	900
	pFManBli13	1,400	1,800	1,200

๓.๓.๒ ผลการวิจัยเกี่ยวกับการค้นหาเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ที่สามารถย่อย mannan ได้

#### วิธีการทดลอง

วิธีการทั้งหมดทำตามวิธีการที่ได้เคยรายงานมาก่อนหน้านี้แล้วโดยห้องปฏิบัติการของ รศ.ดร. สุณีย์ นิธิสินประเสริฐ [17] โดยทำการสกัดแยกเชื้อจากตัวอย่างในสิ่งแวดล้อมในแถบจังหวัดนครราชสีมา โดยสุ่มตัวอย่าง ๑๐ ตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ การมะพร้าว ทุเรียน และดินในบริเวณ มทส แล้วตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลาย mannan

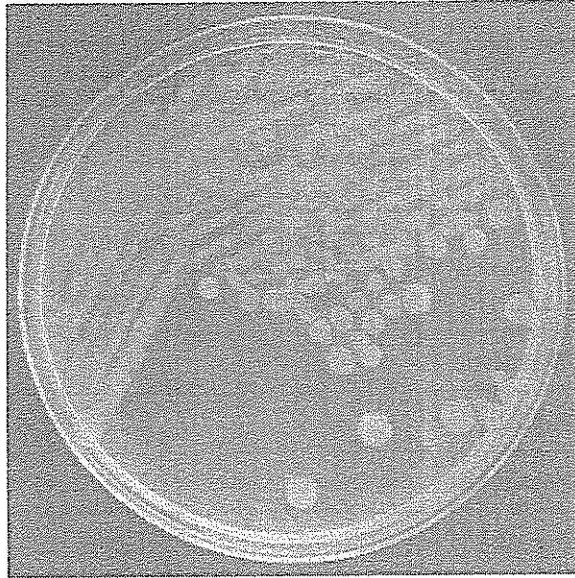
#### ผลการทดลอง

ก) สามารถคัดแยกเชื้อได้ ๓ ชนิด ดังภาพ

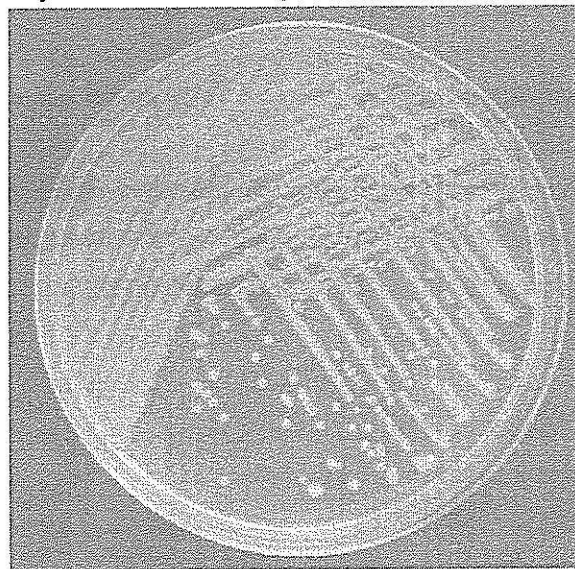
๓.๒.๒.๑ *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*



๓.๒.๒.๒ *Paenibacillus polymyxa* (1994)



๓.๒.๒.๓ *Chryseobacterium indologenes* (1994)



ข) จากการส่งเชื้อไปวิเคราะห์จัดจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยระบบจัดจำแนกชนิดจุลินทรีย์ API พบว่าเชื้อที่คัดแยกได้ทั้ง ๓ สายพันธุ์คือรายละเอียดผลการวิเคราะห์ทางชีวเคมีจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยแสดงในหน้าถัดไป นอกจากนั้นแล้วยังได้ใช้วิธีการหาลำดับ DNA ของ 16s RNA เพื่อการบ่งชี้ชนิดของเชื้อด้วย แต่เนื่องจากเวลา และบุคลากรจำกัดจึงสามารถทำได้เฉพาะเชื้อตัวที่ ๑ และ ๒ โดยพบว่า ลำดับเส้น DNA ของเชื้อตัวที่ ๑ เหมือนกับ *B. subtilis* ribosomal 16sRNA 100% ส่วนเชื้อตัวที่ ๒ เหมือนกับ *B. licheniformis* ribosomal 16sRNA 99% ดังแสดงในภาคผนวกในส่วนท้ายของรายงาน



# สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

10 พฤศจิกายน 2549

เรียน ผศ.ดร.ภญ. มณฑารพ อมาตย์  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี  
111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี  
อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000  
โทรศัพท์ 0-4422-4388, 08-9205-3040 โทรสาร 0-4422-3389

## ใบเสนอราคา

รายการ	จำนวนเงิน ( บาท )
จัดจ้างเทคนิคเบคทีเรีย จำนวน 3 สายพันธุ์	7,000.00
ค่าภาพถ่ายจุลินทรีย์ จำนวน 3 สายพันธุ์	1,200.00
ภาษีมูลค่าเพิ่ม 7%	574.00
ค่าจัดส่ง EMS	50.00
รวม	8,824.00

โปรดส่งค่าบริการตามจำนวนใบเสนอราคา

ทางธนาคารฯ สั่งจ่ายใบนาม

“ ผอ. กองคลัง สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ฯ ” (ไปรษณีย์จตุจักร)

สั่งถึง ศูนย์จุลินทรีย์ (น.ศ.ลาวัลย์ ชลานนท์)  
สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย  
35 หมู่ 3 เขต โนนธานี ตำบลคลองห้า  
อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

หรือ โอนเงินเข้าบัญชี ธนาคารกรุงไทยจำกัด (มหาชน) สาขาสามแยกเกษตร  
ชื่อบัญชี สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย  
เลขที่บัญชี 039-1-07800-3 บัญชีประเภท ออมทรัพย์

หมายเหตุ กรุณาส่งเอกสารการโอนเงินพร้อมกับระบุชื่อที่จะออกใบเสร็จรับเงิน มายังหมายเลข  
โทรสาร 0 2577 9031 (ลาวัลย์)

(น.ศ.ลาวัลย์ ชลานนท์)  
รักษาการในตำแหน่ง  
ผู้อำนวยการศูนย์จุลินทรีย์

โทรศัพท์ 0 2577 9045 (พี่ราวรอด)

โทรสาร 0 2577 9031

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย  
35 หมู่ 3 เขต โนนธานี ตำบลคลองห้า อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120  
โทรศัพท์ 0 2577 9031 โทรสาร 0 2577 9031  
E-mail : ict@vst.go.th Web : ict.vst.go.th





จำนวนบริการที่ 2550 / 013

ที่ สจล.

รายงานผลการทดสอบและวิเคราะห์  
ให้แก่  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การทดสอบ / วิเคราะห์                      จัดจำแนกชนิดแบคทีเรีย  
วิธีทดสอบ / วิเคราะห์                      ระบบจัดจำแนกชนิดจุลินทรีย์ เอ พี ไอ  
ภาวะการทดสอบ / วิเคราะห์ : อุณหภูมิ                      30 °C และ 37 °C  
ผลการทดสอบ / วิเคราะห์

ผลการจัดจำแนกชนิดแบคทีเรีย จำนวน 3 สายพันธุ์ ดังนี้

OA 1 : *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*

OA 2 : *Paenibacillus polymyxa* (1994)

(Synonym : *Bacillus polymyxa*)

OA 3 : *Chryseobacterium indologenes* (1994)

(Synonym : *Flavobacterium indologenes*)

(รายละเอียดสังเคราะห์)

ผู้ทดสอบ / วิเคราะห์

น.ส.พิราวรรณ ศรีศิลป์

ผู้ตรวจสอบ

เสาวลีย์ ชิตานนท์

(น.ส.ลาวัลย์ ชิตานนท์)

ผู้รับรอง

ดร.อาภากรรัตน์ มหาวงษ์

(ดร.อาภากรรัตน์ มหาวงษ์)

รักษาลาภในตำแหน่ง

ผู้อำนวยการศูนย์จุลินทรีย์

วันที่ 14 ก.ย. 49

ผลการทดสอบ / วิเคราะห์นี้ รับรองผลเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทำการทดสอบ / วิเคราะห์เท่านั้น  
ห้ามนำผลการทดสอบ / วิเคราะห์ไปโฆษณาโดยมิได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจาก ทว.

## รายละเอียดการตรวจวิเคราะห์

Table 1. Characteristics of the bacterial strain OA 1 : *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*

Characteristics	Reaction
Gram reaction	+ve
Fermentative production of acid from :	
- glycerol	-
- erythritol	-
- D-arabinose	-
- L-arabinose	+
- ribose	+
- D-xylose	+
- L-xylose	-
- adonitol	-
- β-methyl-D-xyloside	-
- galactose	-
- D - glucose	+
- D - fructose	+
- D - mannose	-
- L - sorbose	-
- rhamnose	-
- dulcitol	-
- inositol	-
- mannitol	-
- sorbitol	+
- α-methyl-D-mannoside	+
- α-methyl-D-glucoside	+
- N-acetyl-glucosamine	+
- amygdaline	+
- arbutine	+

**Remark :** - ve = Gram positive bacteria  
 + = Positive reaction  
 - = Negative reaction

ผลการทดสอบ / วิเคราะห์นี้ รับรองเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทำการทดสอบ / วิเคราะห์เท่านั้น  
 ห้ามนำผลการทดสอบ / วิเคราะห์ไปโฆษณาโดยมิได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจาก วว.

## รายละเอียดการตรวจวิเคราะห์

Table 1. (continued) Characteristics of the bacterial strain OA 1 : *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*

Characteristics	Reaction
Fermentative production of acid from : (continued)	
- esculine	+
- salicine	+
- cellobiose	+
- maltose	+
- lactose	+
- melibiose	-
- sucrose	+
- trehalose	+
- inuline	-
- melezitose	-
- D-raffinose	+
- starch	+
- glycogene	+
- xylitol	-
- β-gentiobiose	-
- D-turanose	-
- D-lyxose	-
- D-tagatose	-
- D-fucose	-
- L-fucose	-
- D-arabitol	-
- L-arabitol	-
- gluconate	-
- 2-keto-gluconate	-
- 5-keto-gluconate	-

Remark : + ve = Gram positive bacteria  
 + = Positive reaction  
 - = Negative reaction

ผลการทดสอบ / วิเคราะห์นี้ รับรองผลเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทำการสอบ / วิเคราะห์เท่านั้น  
 ห้ามนำผลการทดสอบ / วิเคราะห์ไปโฆษณาโดยมิได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจาก จจ



## รายละเอียดการตรวจวิเคราะห์

Table 1. (continued) Characteristics of the bacterial strain OA 1 : *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*

Characteristics	Reaction
$\beta$ -galactosidase production (ortho-nitro-phenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside)	+
Arginine dihydrolase production	-
Lysine decarboxylase production	-
Ornithine decarboxylase production	-
Citrate utilization	-
H <sub>2</sub> S production	-
Urease production	-
Tryptophane deaminase production	-
Indole production of tryptophane	-
Acetoin production	+
Hydrolysis of gelatin	+
Reduction of nitrate	+

*Remark :* + ve = Gram positive bacteria  
 + = Positive reaction  
 - = Negative reaction

ผลการทดสอบ / วิเคราะห์นี้ รับรองเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทำการสอบ / วิเคราะห์เท่านั้น  
 ห้ามนำผลการทดสอบ / วิเคราะห์ไปโฆษณาโดยมิได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจาก จว.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

จว. ๖๖๖ ถนนวิภาวดีรังสิต ตำบลจตุรพักตรพิมาน อำเภอเมืองนนทบุรี จังหวัดนนทบุรี ๑๑๑๖๐๖  
 โทร. ๐๒-๕๖๒-๖๖๖๖ โทรสาร ๐๒-๕๖๒-๖๖๖๖  
 E-mail : baia@vistr.or.th baia@vistr.ac.th

## รายละเอียดการตรวจวิเคราะห์

Table 2. Characteristics of the bacterial strain OA 2 : *Paenibacillus polymyxa*

Characteristics	Reaction
Gram reaction	+ve
Fermentative production of acid from :	
- glycerol	-
- erythritol	-
- D-arabinose	-
- L-arabinose	-
- ribose	-
- D-xylose	+
- L-xylose	-
- adonitol	-
- $\beta$ -methyl-D-xyloside	-
- galactose	+
- D - glucose	+
- D - fructose	+
- D - mannose	+
- L - sorbose	-
- rhamnose	-
- dulcitol	-
- inositol	-
- mannitol	+
- sorbitol	-
- $\alpha$ -methyl-D-mannoside	-
- $\alpha$ -methyl-D-glucoside	+
- N-acetyl-glucosamine	-
- amygdaline	+
- arbutine	+

Remark : +ve = Gram positive bacteria  
 + = Positive reaction  
 - = Negative reaction

ผลการทดสอบ / วิเคราะห์นี้ รับรองเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทำการสอบ / วิเคราะห์เท่านั้น  
 ห้ามนำผลการทดสอบ / วิเคราะห์ไปโฆษณาโดยมิได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจาก จจ



## รายละเอียดการตรวจวิเคราะห์

Table 2. (continued) Characteristics of the bacterial strain OA 2 : *Paenibacillus polymyxa*

Characteristics	Reaction
Fermentative production of acid from : (continued)	
- esculine	+
- salicine	+
- cellobiose	+
- maltose	+
- lactose	+
- melibiose	+
- sucrose	+
- trehalose	+
- inuline	+
- melezitose	-
- D-raffinose	-
- starch	-
- glycogene	+
- xylitol	-
- $\beta$ -gentiobiose	+
- D-turanose	+
- D-lyxose	-
- D-tagatose	-
- D-fucose	-
- L-fucose	-
- D-arabitol	-
- L-arabitol	-
- gluconate	+
- 2-keto-gluconate	+
- 5-keto-gluconate	+

*Remark :* - ve = Gram positive bacteria  
 + = Positive reaction  
 - = Negative reaction

ผลการทดสอบ / วิเคราะห์นี้ รับรองเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทำการสอบ / วิเคราะห์เท่านั้น  
 ห้ามนำผลการทดสอบ / วิเคราะห์ไปโฆษณาโดยมิได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจาก จว.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

491 หมู่ 9 ตำบลวังน้ำเย็น อำเภอวังน้ำเย็น จังหวัดกำแพงเพชร 61150

110 หมู่ 1 ตำบลวังน้ำเย็น อำเภอวังน้ำเย็น จังหวัดกำแพงเพชร 61150

E-mail : [bastr@vsnl.ac.th](mailto:bastr@vsnl.ac.th) [www.vsnl.ac.th](http://www.vsnl.ac.th)



## รายละเอียดการตรวจวิเคราะห์

Table 2. (continued) Characteristics of the bacterial strain OA 2 : *Paenibacillus polymyxa*

Characteristics	Reaction
$\beta$ -galactosidase production (ortho-nitro-phenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside)	+
Arginine dihydrolase production	-
Lysine decarboxylase production	-
Ornithine decarboxylase production	-
Citrate utilization	-
H <sub>2</sub> S production	-
Urease production	-
Tryptophane deaminase production	-
Indole production of tryptophane	-
Acetoin production	-
Hydrolysis of gelatin	-
Reduction of nitrate	-

Remark : +ve = Gram positive bacteria  
 + = Positive reaction  
 - = Negative reaction

ผลการทดสอบ / วิเคราะห์นี้ รับรองเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทำการสอบ / วิเคราะห์เท่านั้น  
 ห้ามนำผลการทดสอบ / วิเคราะห์ไปโฆษณาโดยมิได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจาก บว.

รายละเอียดการตรวจวิเคราะห์

Table 3. Characteristics of the bacterial strain OA 3 : *Chryseobacterium indologenes*

Characteristics	Reaction
Gram reaction	-ve
Reduction of nitrate	-
Indole production of tryptophane	-
Fermentative of acid from glucose	-
Arginine dihydrolase	-
Urease production	+
Hydrolysis of esculin	-
Hydrolysis of gelatin	-
$\beta$ -galactosidase production (p-nitro phenyl- $\beta$ -galactopyranoside)	+
Assimilation of :	
- Glucose	+
- Arabinose	-
- Mannose	+
- Mannitol	-
- N-acetyl-glucosamine	-
- Maltose	+
- Gluconate	-
- Caprate	-
- Adipate	-
- Malate	+
- Citrate	+
- Phenyl-acetate	-
Cytochrome oxidase	+

*Remark :* - ve = Gram negative bacteria  
 + = Positive reaction  
 - = Negative reaction

ผลการทดสอบ / วิเคราะห์นี้ รับรองผลเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทำการสอบ / วิเคราะห์เท่านั้น  
 ห้ามนำผลการทดสอบ / วิเคราะห์ไปโฆษณาโดยมิได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจาก วว.



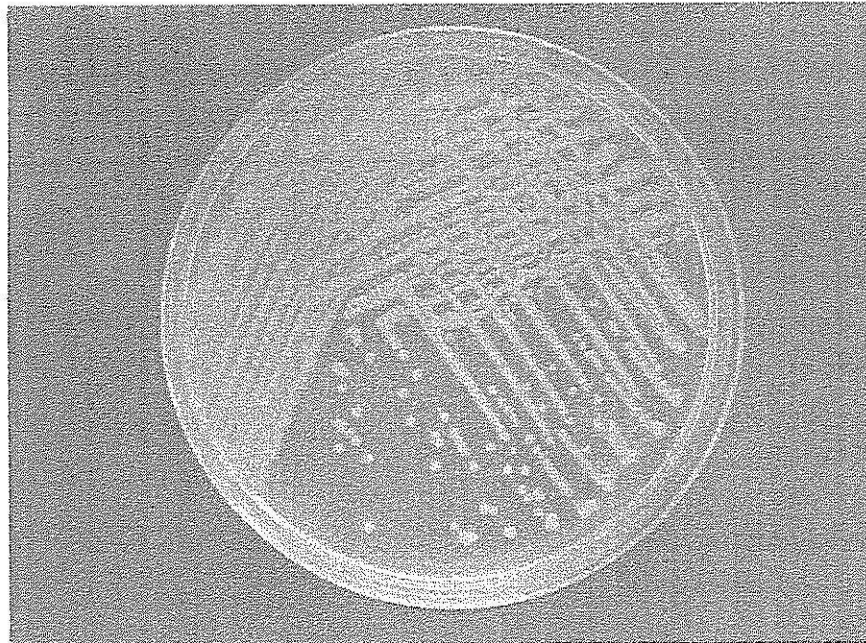


Figure 5. Colony morphology of the bacterial strain OA 3

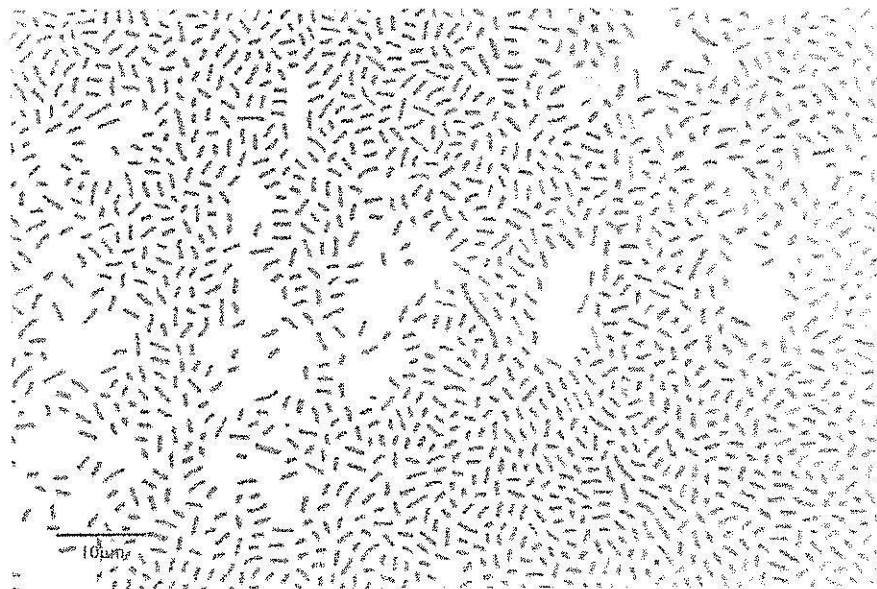


Figure 6. Cell morphology of the bacterial strain OA 3  
(x100 objective, phase-contrast microscope)



๑๑.

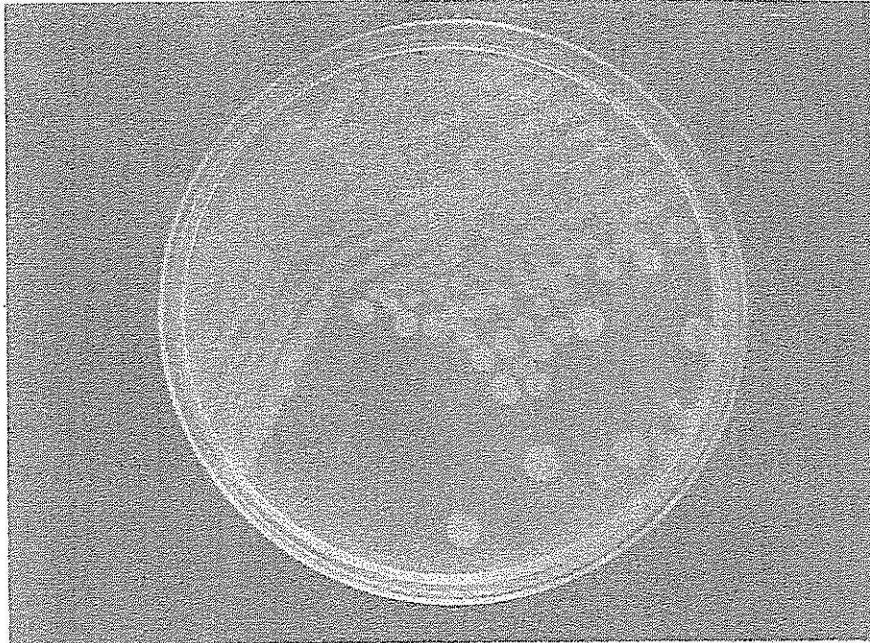


Figure 3. Colony morphology of the bacterial strain OA 2

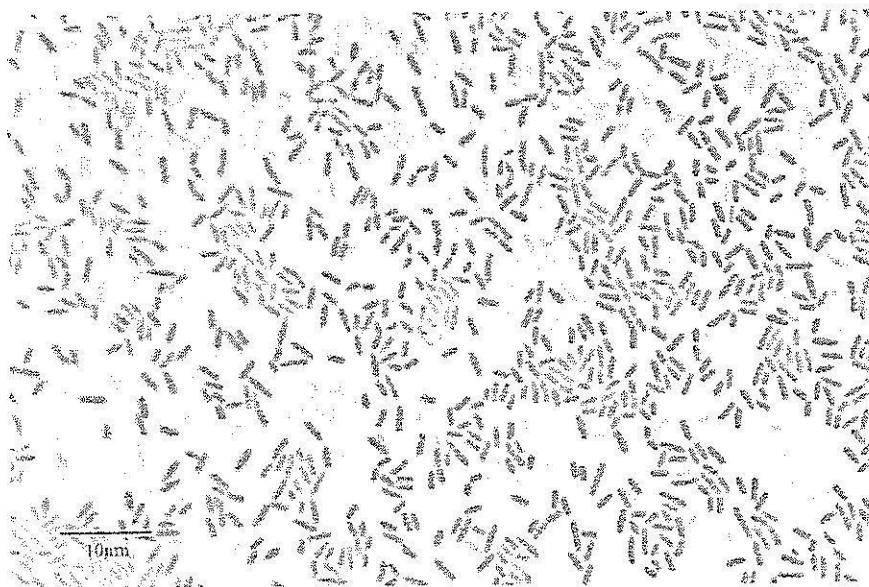


Figure 4. Cell morphology of the bacterial strain OA 2  
(x100 objective, phase-contrast microscope)

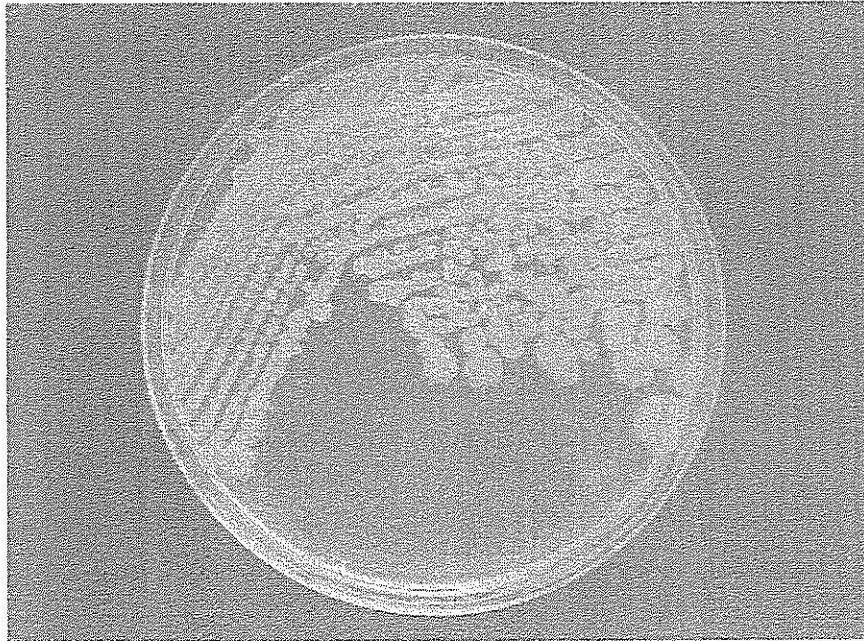


Figure 1. Colony morphology of the bacterial strain OA 1

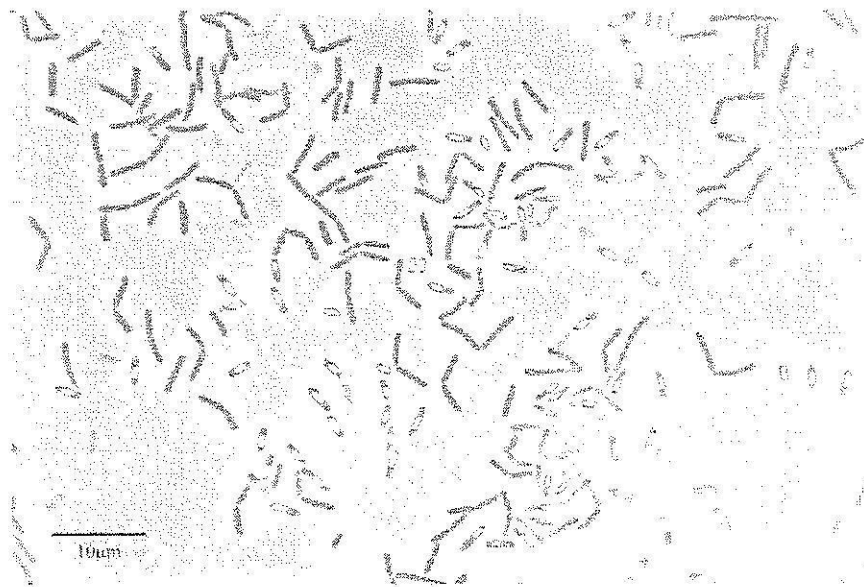


Figure 2. Cell morphology of the bacterial strain OA 1  
(x100 objective, phase-contrast microscope)

## บทที่ ๔

### บทสรุป

#### ๔.๑ สรุปผลการวิจัยทั้งหมด

ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการพัฒนาเอนไซม์ที่มีศักยภาพในการนำไปใช้การผลิตฟรีไบโอดีจากกากมะพร้าวในระดับอุตสาหกรรม โดยได้พัฒนาเอนไซม์ขึ้นมา ๔ ชนิด ทั้งหมดเป็นเอนไซม์ที่เรียกชื่อง่ายๆ ว่า แมนนาเนส (mannanase) โดยเป็นเอนไซม์ที่ได้มาจากทั้งจุลินทรีย์ประเภท รา และแบคทีเรีย ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้มีคุณสมบัติสามารถผลิตให้ได้ในปริมาณมาก เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ต่อไป

เอนไซม์ตัวแรกคือเอนไซม์ mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase ที่ได้จากเชื้อรา *Aspergillus niger* BK01 คัดแยกมาจากอาหารหมักในแถบเมือง ฮานอย ประเทศเวียดนาม เป็นเอนไซม์ในตระกูล glycosyl hydrolase 5 ที่ทนความร้อนได้ดี (thermostable) สามารถผลิตได้เป็นจำนวนมาก คือมากถึง 243  $\mu$ g ต่อ มิลลิเมตร โดยใช้ระบบการแสดงออกของยีสต์ *Pichia pastoris* โดยเอนไซม์จะถูกหลั่งออกมาออกเซลล์ลงไปในน้ำเลี้ยงเชื้อทำให้สะดวกต่อการเก็บเกี่ยวและนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อ จากการวิเคราะห์พบว่าเอนไซม์นี้ถูกปรับแต่งด้วยน้ำตาล (glycosylation) ทำให้มีน้ำหนักโมเลกุลเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE เท่ากับ 53 kDa

เอนไซม์ที่ถูกพัฒนาขึ้นด้วยวิธีการทางพันธุวิศวกรรมนี้สามารถทนความร้อนได้สูง คือมีค่าครึ่งชีวิตที่อุณหภูมิ ๗๐ องศาเซลเซียส ที่ค่าความเป็นกรดต่าง ๔ เท่ากับ ๕๖ ชั่วโมง ผลการวิเคราะห์ในช่วงเวลา ๑๐ นาที พบว่าอุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดที่เหมาะสมในการทำกิจกรรมของเอนไซม์คือที่ ๗๐ องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดต่าง ๔ ตามลำดับ เอนไซม์นี้สามารถย่อย mannan ที่มีโครงสร้างต่างๆ จากพืชหลายชนิดได้ดี และสามารถย่อย xylan จากต้น birchwood ได้เล็กน้อย ค่าจลศาสตร์ Km ของเอนไซม์นี้ต่อสารตั้งต้นต่างๆ ได้แก่ konjac glucomannan (ความหนืดต่ำ), locust bean gum galactomannan, carob galactomannan (ความหนืดต่ำ), and 1,4-beta-D-mannan (ความหนืดต่ำ) คือ 0.6 mg mL<sup>-1</sup>, 2.0 mg mL<sup>-1</sup>, 2.2 mg mL<sup>-1</sup> และ 1.5 mg mL<sup>-1</sup> ตามลำดับ ส่วนค่า kcat คือ 215 s<sup>-1</sup>, 330 s<sup>-1</sup>, 292 s<sup>-1</sup> and 148 s<sup>-1</sup> ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ค่าคงที่ทางจลศาสตร์ kcat/Km สาร glucomannan เป็นสารตั้งต้นที่ดีที่สุดของเอนไซม์ mannanase นี้ นอกจากนั้นแล้วผลการวิเคราะห์สารโดยการแยกส่วนผ่านแผ่นบาง (thin layer chromatography) พบว่า ผลผลิตหลักจากการย่อยสลายสารตั้งต้น locust bean gum คือ mannobiose และยังมี mannotriose กับ manno-oligosaccharides ขนาดใหญ่ปนมาบ้างเล็กน้อย

ส่วนเอนไซม์ ๒ ตัวถัดมาที่ได้พัฒนาขึ้นคือเอนไซม์ mannan endo-1,4-beta-mannosidase (manB) หรือเป็นที่รู้จักกันโดยทั่วไปว่าเอนไซม์ beta-mannanase จากเชื้อ *Bacillus licheniformis* สายพันธุ์ DSM13 และสายพันธุ์ DSM 8785 ซึ่งสั่งซื้อมาจากสถาบันเก็บรวบรวมจุลินทรีย์ และเซลล์ประเทศ สหพันธรัฐเยอรมัน เป็นแบคทีเรียที่ปลอดภัย และนิยมใช้มากในอุตสาหกรรม เอนไซม์จากแบคทีเรียทั้ง ๒ สายพันธุ์มีความคล้ายคลึงกันมาก โดยได้ทำการโคลนยีนขึ้นด้วยวิธีการ PCR และนำไปแสดงออกให้ได้เป็นจำนวนมาก ในแบคทีเรีย *Escherichia coli* ซึ่งในระบบการแสดงออกของเอนไซม์ที่ได้พัฒนาขึ้นมา นี้ สามารถทำการเก็บเกี่ยวเอนไซม์ ได้จากทั้ง ภายในเซลล์ ในส่วนช่องว่างระหว่างผนังเซลล์ (periplasmic space) หรือจากน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยสามารถผลิตเอนไซม์ได้เป็นจำนวนมากสูง คือมีค่ากิจกรรมรวมประมาณ 50,000 units จากการเลี้ยงในน้ำเลี้ยงปริมาณ ๑ ลิตร เอนไซม์ที่ได้จากวิธีการพันธุวิศวกรรมนี้มีโครงสร้าง 6xHis-tag เชื่อมอยู่ที่ปลาย C-terminus จึงสามารถนำไปทำให้บริสุทธิ์ได้ง่ายและสะดวก

ด้วยวิธีการเพียงชั้นเดียวด้วยการใช้ immobilized metal affinity chromatography (IMAC) ค่าจำเพาะในการทำกิจกรรมของเอนไซม์ (specific activity) ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์แล้วเมื่อใช้ locust bean gum เป็นสารตั้งต้นคือ 1672 +/- 96 units/mg โดยสภาวะที่เหมาะสมในการทำกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ที่อุณหภูมิ ๕๐ องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดต่าง ในช่วง ๖ ถึง ๗ ตามลำดับ เอนไซม์นี้สามารถทนค่าความเป็นกรดต่างระหว่าง ๕ - ๑๒ ได้นาน ๓๐ นาที ที่อุณหภูมิ ๕๐ องศาเซลเซียส และสามารถทนค่าความเป็นกรดต่างระหว่าง ๖ - ๘ ได้นาน ๒๔ ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ ๕๐ องศาเซลเซียส ส่วนความทนทานในอุณหภูมิต่างๆ พบว่า เอนไซม์นี้สามารถทนความร้อนได้ถึง อุณหภูมิ ๕๐ องศาเซลเซียส และมีค่าครึ่งชีวิต (T1/2) ประมาณ ๘๐ ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ ๕๐ องศาเซลเซียส ในสภาวะความเป็นกรดต่าง ๖ ผลการวิเคราะห์สารโดยการแยกส่วนผ่านแผ่นบาง (thin layer chromatography) พบว่า ผลผลิตหลักจากการย่อยสลาย locus bean gum mannan คือ manno-oligosaccharide ขนาดต่างๆ ตั้งแต่ M2 - M6 รวมทั้งน้ำตาล mannose

ส่วนเอนไซม์อีกตัวหนึ่งคือเอนไซม์ mannan endo-1,4-beta-mannosidase (manB) หรือเป็นที่รู้จักกันโดยทั่วไปว่าเอนไซม์ beta-mannanase จากเชื้อ *Bacillus subtilis* 168 วิธีการโคลนและการผลิตเอนไซม์ให้ได้เป็นจำนวนมาก และวิธีการทำให้บริสุทธิ์ เหมือนกับวิธีการที่ใช้กับเอนไซม์จากเชื้อ *B. licheniformis* ที่ได้กล่าวมาข้างต้น ค่าจำเพาะในการทำกิจกรรมของเอนไซม์ (specific activity) ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์แล้วเมื่อใช้ locust bean gum เป็นสารตั้งต้นคือ 962 +/- 53 units/mg โดยสภาวะที่เหมาะสมในการทำกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ที่อุณหภูมิ ๕๐ องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดต่าง ๖ ตามลำดับ เอนไซม์นี้สามารถทนค่าความเป็นกรดต่างระหว่าง ๒ - ๘ ได้นาน ๓๐ นาที ที่อุณหภูมิ ๕๐ องศาเซลเซียส และสามารถทนค่าความเป็นกรดต่าง ๖ ได้นาน ๒๔ ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ ๕๐ องศาเซลเซียส ผลการวิเคราะห์สารโดยการแยกส่วนผ่านแผ่นบาง (thin layer chromatography) พบว่า ผลผลิตหลักจากการย่อยสลาย locus bean gum mannan คือ manno-oligosaccharide ขนาดต่างๆ ตั้งแต่ M2 - M6 รวมทั้งน้ำตาล mannose เช่นกัน แต่สามารถผลิต M4 ได้มากกว่าเอนไซม์จาก *B. licheniformis*

นอกจากนั้นแล้วผู้วิจัยยังสามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียอีก ๓ ตัว ที่สามารถย่อยสลาย mannan ซึ่งบ่งชี้ว่าเชื้อเหล่านี้มีเอนไซม์ mannanase อยู่ด้วย แต่อย่างไรก็ตามคุณสมบัติของเอนไซม์ไม่ได้โดดเด่น อาทิเช่นไม่ทนอุณหภูมิ และมีค่ากิจกรรมจำเพาะไม่สูงมากนัก ในสภาวะที่มีข้อจำกัดทางการเงิน จึงไม่คุ้มค่าต่อการทำการโคลนยีนของเอนไซม์ mannanase เพื่อทำการศึกษาวิจัยต่อ แต่อย่างไรก็ตามอาจน่าสนใจที่จะนำมาศึกษาต่อไปในเชิงวิทยาศาสตร์บริสุทธิ์ต่อไป หากมีบุคลากรและปัจจัยเพียงพอ

#### ๔.๒ ข้อวิจารณ์

หากอ่านจากผลการวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการแล้ว จะเห็นได้ว่าขอบเขตการประยุกต์ใช้ของเอนไซม์ที่ได้รับการพัฒนามานี้กว้างขวางกว่าการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการผลิตฟรีไบโอติกจากกากมะพร้าวเท่านั้น แต่สามารถนำไปใช้ในงานวิจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวกับการย่อยวัสดุชีวภาพประเภท lignocellulose ที่เป็นทรัพยากรธรรมชาติที่มีอยู่มากมายภายในประเทศ และผลผลิตที่ได้นอกจากการผลิตฟรีไบโอติกจากกากมะพร้าวที่มีมูลค่าเพิ่มสูงมากแล้ว ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานทางเทคโนโลยีชีวภาพได้อีกหลายประเภท อาทิเช่นใช้ในกระบวนการผลิตพลังงานทดแทน second generation biofuel, การฟอกสีผลิตภัณฑ์จากพืช, การผลิตกาแฟสำเร็จรูป และผสมในน้ำยาซักฟอกเป็นต้น ซึ่งในขั้นต่อไปผู้วิจัยจะได้นำผลงานนี้ไปทำการวิจัยเชิงประยุกต์ต่อยอด เพื่อผลิต MOS จากกากมะพร้าว เพื่อการพาณิชย์ในลำดับต่อไป โดยผลจากการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ชี้ให้เห็นว่า เอนไซม์แต่ละ

ตัวมีข้อเด่นต่างกันไป จึงจะลองนำเอนไซม์ทั้ง ๔ ชนิดที่พัฒนาขึ้นมาได้ มาใช้ร่วมกันในการผลิตฟรีไบโอติกจากกากมะพร้าวในระดับอุตสาหกรรมต่อไป รวมทั้งยังอาจต้องใช้เอนไซม์อื่นๆ ที่เหมาะสมเพิ่มเติมอีกด้วย

อนึ่งนอกจากเอนไซม์ที่ได้พัฒนาขึ้นเพื่อการประยุกต์ใช้ในทางเทคโนโลยีชีวภาพด้านต่างๆ แล้ว ยังมีองค์ความรู้ใหม่ที่เกิดขึ้นจากการวิจัยนี้ คือ โครงสร้างในระดับปฐมภูมิเชิงลึก (primary structure) ของเอนไซม์ mannanase ทั้ง ๔ ตัว รวมทั้งคุณสมบัติของเอนไซม์ในเชิงชีวเคมี และวิธีการผลิตเอนไซม์ด้วยเทคโนโลยีพันธุวิศวกรรมโดยใช้แบคทีเรีย *E. coli* และยีสต์ *Pichia pastoris* เป็นเซลล์เจ้าบ้านอีกด้วย องค์ความรู้ใหม่ที่ได้สร้างขึ้น ซึ่งได้รับการเผยแพร่ออกไปแล้ว จะเป็นประโยชน์ต่อนักวิทยาศาสตร์ และนักวิจัยทั่วโลก เพื่อการพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแขนงนี้ให้ก้าวขวางยิ่งขึ้นต่อไป

อันที่จริงในขั้นต้นที่ข้าพเจ้าเขียนโครงการวิจัยนี้ ต้องการจะทำไปจนถึงขั้นการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ MOS จากกากมะพร้าวออกมา เพื่อนำไปสู่การผลิตในเชิงพาณิชย์ แต่เนื่องจากด้วยนโยบายของ มทส ทำให้งบประมาณในการทำวิจัยถูกตัดลงไปอย่างมาก คือมากกว่าครึ่งหนึ่งที่ขอไป ทำให้ไม่สามารถดำเนินการในส่วนนี้ได้ แต่อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยคิดว่า ความสำเร็จจากโครงการนี้เป็นที่น่าพอใจเพราะสามารถหาเอนไซม์ที่ดีพอสำหรับการประยุกต์ใช้ในอนาคต ซึ่งจะได้ทำการเสนอโครงการเพื่อทำการวิจัยต่อยอดในลำดับต่อไป

## บรรณานุกรม

1. Costalos, C.; Kapiki, A.; Apostolou, M.; Papatoma, E., The effect of a prebiotic supplemented formula on growth and stool microbiology of term infants. *Early Human Development* **2008**, 84, (1), 45-49.
2. Cummings, J. H.; Macfarlane, G. T.; Englyst, H. N., Prebiotic digestion and fermentation. *Am. J. Clin. Nutr.* **2001**, 73 (Suppl.), 415S-420S.
3. Rastall, R. A.; Gibson, G. R.; Gill, H. S.; Guarner, F.; Klaenhammer, T. R.; Pot, B.; Reid, G.; Rowland, I. R.; Sanders, M. E., Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: an overview of enabling science and potential applications. *FEMS Microbiol Ecol* **2005**, 52, (2), 145-52.
4. Gibson, G. R.; Rastall, R. A., *Prebiotics : Development & Application*. John Wiley & Sons Ltd.: 2006; p 256.
5. Crittenden, R. G.; Playne, M. J., Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends in Food Science & Technology* **1996**, 7, 353-361.
6. Casewell, M.; Friis, C.; Marco, E.; McMullin, P.; Phillips, I., The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *J Antimicrob Chemother* **2003**, 52, (2), 159-61. Epub 2003 Jul 1.
7. Pianoa, M.; Del Morellic, L.; Strozzi, G.; Allesinab, S.; Barbab, M.; Deiddab, F.; Lorenzinib, P.; Ballar 'ea, M.; Montinoa, F.; Orselloa, M.; Sartoria, M.; Garelloa, E.; Carmagnolaa, S.; Pagliaruloa, M.; L., C., Probiotics: from research to consumer. *Digestive and Liver Disease Suppl* **2006**, 38 (2), S248-S255.
8. Salminen, S.; Bouley, C.; Boutron-Rualt, M. C., Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition* **1998**, 80, (1), 147-171.
9. Fioramonti, J.; Theodorou, V.; Bueno, L., Probiotics: what are they? What are their effects on gut physiology? *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* **2003**, 17, (5), 711-724.
10. Monsan, P.; Paul, F., Enzymatic synthesis of oligosaccharides. *FEMS Microbiology Reviews* **1995**, 16, (2-3), 187-192.
11. Do, B. C.; Dang, T. T.; Berrin, J. G.; Haltrich, D.; To, K. A.; Sigoillot, J. C.; Yamabhai, M., Cloning, expression in *Pichia pastoris*, and characterization of a thermostable GH5 mannan endo-1,4-beta-mannosidase from *Aspergillus niger* BK01. *Microb Cell Fact* **2009**, 8, 59.
12. Songsiriritthigul, C.; Buranabanyat, B.; Haltrich, D.; Yamabhai, M., Efficient recombinant expression and secretion of a thermostable GH26 mannan endo-1,4-beta-mannosidase from *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* **2010**, 9, (1), 20.
13. McCleary, B. V., A simple assay procedure for beta-D-mannanase. *Carbohydr Res* **1978**, 67, (1), 213-21.
14. Abe, J.-i.; Hossain, M. Z.; Huzukuri, S., Isolation of [beta]-mannanase-producing microorganism. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **1994**, 78, (3), 259-261.
15. Yamabhai, M.; Sukasem, S.; Pesatcha, P.; Jaruseranee, N.; Jankangram, W.; Rattanasuk, S.; Emrat, S. In *Secretion of Bacillus hydrolytic enzymes in Escherichia coli expression system*, June 24-28, 2006, 10th

- International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms, Prague, Czech Republic, 2006; (poster): Prague, Czech Republic, 2006.
16. Gübitz, G.; Sachslehner, A.; Haltrich, D. In *Microbial mannanases: substrates, production and application*, Glycosyl Hydrolases for Biomass Conversion, Washington, DC, 2001; Himmel, M. E.; Baker, J. O.; Saddler, J. N., Eds. ACS Symposium Series vol 769, American Chemical Society: : Washington, DC, 2001; pp 239-262.
  17. Titapoka, S.; Keawsompong, S.; Haltrich, D.; Nitisinprasert, S., Selection and characterization of mannanase-producing bacteria useful for the formation of prebiotic manno-oligosaccharides from copra meal. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **2008**, 24, (8), 1425-1433.



## ภาคผนวก

### ภาคผนวก ก: การเผยแพร่ผลงานวิจัย

#### ๑. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

1. Do, B. C.; Dang, T. T.; Berrin, J. G.; Haltrich, D.; To, K. A.; Sigoillot, J. C.; Yamabhai, M., Cloning, expression in *Pichia pastoris*, and characterization of a thermostable GH5 mannan endo-1,4-beta-mannosidase from *Aspergillus niger* BK01. *Microb Cell Fact* 2009, 8, 59.
2. Songsiririthigul, C.; Buranabanyat, B.; Haltrich, D.; Yamabhai, M., Efficient recombinant expression and secretion of a thermostable GH26 mannan endo-1,4-beta-mannosidase from *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* 2010, 9, (1), 20.

#### ๒. ผลงานนำเสนอในงานประชุมทางวิชาการต่างๆ

1. Yamabhai, M.; Sukasem, S.; Pesatcha, P.; Jaruseranee, N.; Jankangram, W.; Rattanasuk, S.; Emrat, S. In Secretion of *Bacillus* hydrolytic enzymes in *Escherichia coli* expression system. , June 24-28, 2006, 10th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms, Prague, Czech Republic, 2006; (poster): Prague, Czech Republic, 2006.
2. Songsiririthigul, C.; Buranabanyat, B.; Laboonreung, S.; Yamabhai, M., Crystallization of *Bacillus* Beta Mannanase. In Third Annual Symposium of Protein Society of Thailand (PST), Chulabhorn Research Institute Conference Center, 2008.
3. Yamabhai, M.; Buranabanyat, B.; Do, B. C.; Haltrich, D. In Expression and Characterization of Endo- $\beta$ -Mannanases from *Bacillus subtilis* 12th Asia Pacific confederation of Chemical Engineering Congress (APCChE 2008): Biotechnology, Dalian, China, 4-6 August 2008, 2008; Dalian, China, 2008.
4. Buranabanyat, B.; Rattanasuk, S.; Emrat, S.; Yamabhai, M. In Cloning and Expression of  $\beta$ -mannanase from *Bacillus subtilis* (oral), The 11th Biological Sciences Graduate Congress "Explorations Towards the Improved Quality of Life, Sustainable Development, and Secured Future", Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, 15-17 December 2006, 2006; Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, 2006.
5. Rattanasuk, S.; Yamabhai, M. In Isolation of  $\beta$ -mannanase-producing Bacteria (oral), The 11th Biological Sciences Graduate Congress "Explorations Towards the Improved Quality of Life, Sustainable Development, and Secured Future" Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, 15-17 December 2006 2006; Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, 2006.
6. Yamabhai, M.; Nakkharat, P.; Divne, C.; Nguyen, V. C.; Nitisinprasert, S.; Sundara, S.; Haltrich, D. In Production of prebiotic oligosaccharides from under-utilised agricultural by-products by using enzyme technology (poster), AUNP Grantholder Meeting, Manila, Philippines, 25-26 August 2005, 2005; Manila, Philippines, 2005.

7. Do, B. C.; Pesutcha, P.; Emrat, S.; Buranabanyat, B.; Dang, T. T.; Haltrich, D.; Yamabhai, M. In Cloning and Expression of Bacillus beta-Mannanase in Escherichia coli (poster), Bio Thailand 2005, Biotechnology: Challenges in the 21st century, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand, 2-5 November 2005, 2005; Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand, 2005.
8. Yamabhai, M.; Nakkharat, P.; Divne, C.; Nguyen, V. C.; Nitisingprasert, S.; Sundara, S.; Haltrich, D. In Production of Prebiotic Oligosaccharides from Under-utilised Agricultural By-products by Enzyme Technology, The 2nd International Conference on Biocatalyst in the Food and Drinks Industries (poster), University of Hohenheim, Stuttgart, Germany, 19 - 22 September 2004, 2004; University of Hohenheim, Stuttgart, Germany, 2004.

## ภาคผนวก ข: รายการครุภัณฑ์

Autoclave:	Hiclave HA-3000MIV, Hirayama, Japan
Balance:	Precisa 205A, Precisa Instruments, Switzerland Precisa 3000C, Precisa Instruments, Switzerland
Centrifuge machine:	Sorvall RC5C plus, Kendro laboratory Products, USA Eppendorf centrifuge 5810 R, Eppendorf, US
Deep freezer - 70 °C:	Heto, Ultra Freeze, Denmark.
ELISA reader:	Sunrise, TECAN, Austria
Electroporator :	Eppendorf 2510, Eppendorf, USA
Freezer -20 ° C:	Heto, HLLF 370, Denmark. MyBio LFT420, DAIREI, Denmark
Gel Document set:	White/Ultraviolet Transilluminator GDS7500, UVP, USA Digital Graphic Printer UP-D890, Sony, Japan.
Gel dryer:	Drygel sr. SLAB GEL Dryer model SE1160, Hofer Scientific Instruments, USA
Gel electrophoresis:	Mini Protean® 3 cell, BioRad, USA
Heat Box:	HB1, Wealtee Corp., USA
Incubator shaker:	C24 Incubator shaker, New Brunswick Scientific, USA
Incubator:	Memmert, BE 500, WTB Binder BD115, Shel-Lab 2020 Low Temperature Incubator, Sheidon, USA
Laminar hood:	Holten LaminAir HBB 2448, Denmark. BH2000 Series ClassII Biological Safety Cabinets, BHA120 & BHA180, Clyde-Apac,
Membrane transfer:	Semi Phor, Hofer Scientific instruments, USA
Microcentrifuge:	Mini spin plus, Eppendorf, USA Eppendorf 54154, Eppendorf, Germany
pH meter:	Ultra Basic pH meter UB-10, Denver Instruments, Germany
PCR machine:	DNA Engine PTC 200 peltier Thermal cyclers, MJ Research, USA
Rotator:	Certomat TCC, B. Braun Biotech International, Germany Rotator AG, Fine PCR, Korea
Shaker:	Innova 2300 platform shaker, New Brunswick Scientific, UK Certomat TC2, B. Braun Biotech International, Germany
Sonicator:	Waken GE100 Ultrasonic processor, Japan
Spectrophotometer:	Ultrospec 2000, Pharmacia biotech, UK
Stirrer:	Variomag Electronicrührer Poly 15, Germany Magnetic stirrer MSH300, USA Hot plate stirrer Labtech, Korea
Thermomixer:	Thermomixer compact, Eppendorf, USA

ภาพผนวก ก: ผลการวิเคราะห์ลำดับเส้น DNA ของยีน 16sRNA

DNA of PCR products cloned into pGEMT EcoRI sites, sequenced by Macrogen (Korea)

>Isolate1

ACTAGTGAATACGGCTACCTTGTTACGACTTCACCCCAATCATCTGTCCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCATAAAGGTTACCTCACC  
 GACTTCGGGTGTTACAAACTCFCGTGGTGTGACGGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCGCGGCATGCTGATCCGCG  
 ATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACAGAGATTGTTGGGATTTGGCTTAACCTCGC  
 GGTTCGGTGCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCAGTGTGTAGCCAGGTATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCT  
 TCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCTAATGATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACT  
 TAACCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACTGTCTGCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGAT  
 TGTGAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTGTCTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTC  
 ATTCCCTTTGAGTTTACGCTTTCGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGTCTAATGCGTTAGCTGCAGCCTAAGGGGCGGAAACCC  
 TAACACTTAGCACTCATCGTTACGGCGTGGACTACCAGGTATCTAATCCTGTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAG  
 TTACAGACAGAGAGTGCCTTCGCCACTGGTGTCTCCACATCTCTAGCATTTCACCGCTACAGGTGAATCCACTCTCCTC  
 TTCGCACTCAAGTTCACAGTTTCCAATGACCTCCCCGGTGGAGCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCTTCGCGAG  
 CCTTTACGCCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGT  
 TAGGTACCGTCAAGGTGCCGCCCTATTTGAACGGCACTTGTCTTCCCTAACACAGAGCTTTACGATCCGAAACCTTCTACAT  
 CACCGGGGCTTCTCCGTGAGACTTTCGTCCATTCGCGAAGATTCCCTACTGTGCTCCCGTAGGAGTCTGGGCGGTGTCTCAGT  
 CCCAGTGTGGCCGATACCCCTCAGGTGCGCTACGCATCTGTGCTTGGTGGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGG  
 GGTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTATGTCTGAACCATGCGGTTCAAACAACCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCC  
 CGGAGTTATCCAGTCTTACAGGCAGGTACCCACGTGTACTCACCCGTCGCGCCGTAACATCAGGGAGCAAGCTCCCATCTGTG  
 CGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGACGCTTCGCTCTGAGCCAGGATCAAACCTCTAATC

>Isolate2

GATTAGAGTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCC  
 TGATGTTAGCGGCGGACCGGTTGAGTAACACGTTGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGAAACCGGGGCTAATACCGG  
 ATGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCCTTACAGATGGACCCGCGCGCATTAGCTAGTTGG  
 TGAGGTAATGGCTCACAAGGCAACGATGCGTAGCCGACTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTC  
 CTACGGGAGGACAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACCGCGGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGGATC  
 GTAAAGCTCTGTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTGCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAAT  
 ACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTTCCGGAATATTTGGGCGTAAGGGCTCGCAGGCGGTTCTTAAAGT  
 CTGATGTGAAAGCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAATGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAAAAGAGGAGAGTGAATTCACAGT  
 GTAGCGGTGAAATGCCGTANAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAANGCGACTCTCTGCTGTGTAAGTACGCTGAGGAGCGGAAAGC  
 GTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACCGCTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGTTTCCGCCCTTAGTG  
 CTGCAGCTAACGATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGGTCCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATGACGGGGGCCCCGACAAGCG  
 GTGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACCGCAAGAACCTTACCAGGTTTACATCTCTGACAATCCTTAGAGATAGGACGTCCTC  
 CTTCCGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGCTCAGTCTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC  
 CTTGATCTTAGTGGCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAGGTGGGGATGACGTCAAATC  
 ATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCAC  
 AAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTCGGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTT  
 GAATACGTTCCCGGCCCTTGTACACACCGCCCTCACACCAGAGGTTTGTAAACCCGAAGTCCGGTGAAGTACCTTTTAGGAG  
 CCAGCCCGGAAGGTGGGACAGATGATTGGGTTGAAGTCCGTAACAAGGTAGCCGTAATCAGTAGT



## ประวัตินักวิจัย

มนฑารพ ยมาภย์ เกิดเมื่อวันที่ ๘ มกราคม ๒๕๑๐ เป็นบุตรของ รศ.ดร. สวนิต และ ผศ. อ่ำไพ ยมาภย์ จบการศึกษาทั้งในระดับประถม และ มัธยมศึกษาจากโรงเรียนสาธิตจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากนั้นเข้าศึกษาต่อที่ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้รับปริญญาตรีเภสัชศาสตร์บัณฑิตเกียรตินิยม เมื่อปี พ.ศ. ๒๕๓๒ แล้วได้เข้ารับราชการเป็นเภสัชกรประจำโรงพยาบาลหัวตะพานเป็นเวลา ๑ ปี ก่อนจะมาเป็นอาจารย์ประจำคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ในปี ๒๕๓๖ ได้รับทุน Fulbright Pre-doctoral Fellowship ไปทำงานวิจัยที่ University of Minnesota เป็นเวลา ๕ เดือน แล้วจึงได้รับทุนรัฐบาลไทยไปเรียนต่อในระดับปริญญาเอกที่ University of North Carolina at Chapel Hill ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยมี Prof. Dr. Brian K. Kay เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา จบการศึกษาระดับปริญญาเอกด้าน molecular biology ในปี พ.ศ. ๒๕๔๑ จากนั้นในปี พ.ศ. ๒๕๔๓-๒๕๔๕ ได้ทุนไปทำ post-doctoral research ที่ ห้องปฏิบัติการของ Prof. Dr. Richard G.W. Anderson ณ. University of Texas, Southwestern Medical Center, Dallas และในปี พ.ศ. ๒๕๔๖-๒๕๔๗ ได้รับทุน Alexander von Humboldt Fellowship ไปทำการวิจัยที่ห้องปฏิบัติการของ Prof. Dr. Kai Simons ณ. Max Planck Institute for Molecular Biology and Genetics กรุง Dresden ประเทศ สหพันธรัฐเยอรมัน สมรสกับ ศ.ดร. ดิฐฐมา हालทิช เมื่อวันที่ ๑๖ สิงหาคม ๒๕๔๗ และมีบุตร ๑ คน ชื่อ ดญ. สุานิกา ยมาภย์ हालทิช ปัจจุบันเป็นรองศาสตราจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี งานวิจัยในปัจจุบันเป็นงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพเชิงอนุ (molecular biotechnology) มุ่งเน้นการใช้เทคโนโลยีเฟจ (phage display technology) และ เทคนิคอนุวิวัฒนาการ (molecular evolution) ในงานทางวิศวกรรมแอนติบอดี (antibody engineering) และ วิศวกรรมเอนไซม์ (enzyme engineering)

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ถ. มหาวิทยาลัย อ. เมือง จ. นครราชสีมา ๓๐๐๐๐

โทร ๐๔๔ ๒๒๔๑๕๒-๔ ๒๒๔๒๓๔ หรือ ๒๔๔๓๘๘ โทรสาร ๐๔๔ ๒๒๔๑๕๐

Email: montarop@g.sut.ac.th