การศึกษาสมบัติของเอนไซม์แมนนาเนส จากแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการย่อยแมนแนน

CHARACTERIZATION OF MANNANASE FROM POTENTIAL MANNAN-DEGRADING BACTERIA

ขวัญคณิศร์ อินทรตระกูล
Kwankanit Intaratrakul

บทคัดย่อ

เอนไซม์แมนนาเนสเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยพอลิแซคคาไรด์ประเภทแมนแนนซึ่งนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมหลากหลายด้าน เอนไซม์แมนนาเนสผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิดโดยเฉพาะแบคทีเรีย โดยเอนไซม์จากจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีสมบัติที่แตกต่างกัน งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงในการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากบริเวณที่มีกากมะพร้าวเหลือทิ้ง รวมถึงการจัดจำแนกสายพันธุ์ และศึกษาสมบัติของเอนไซม์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ จากการวิจัยพบว่าไอโซเลต KD109 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 1.58 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งจากการจัดจำแนกสายพันธุ์ของไอโซเลต KD109 โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA พบว่ามีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Klebsiella pneumoniae* มากกว่า 99% และเมื่อศึกษาสมบัติของเอนไซม์แมนนาเนสจากเชื้อดังกล่าวพบว่าเอนไซม์มีอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมในการทำงาน คือ 50 องศาเซลเซียส และพีเอช 6 นอกจากนี้จากการศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้นชนิดต่าง ๆ พบว่าเอนไซม์มีความจำเพาะสูงสุดต่อสารประกอบประเภทแมนแนน ได้แก่ คอนยัค รองลงมาเป็นโลคัสบีนกัม นอกจากนี้ยังแสดงกิจกรรมต่อกากมะพร้าวซึ่งเป็นวัตถุดิบเหลือทิ้งที่มีแมนแนนเป็นองค์ประกอบอยู่ในปริมาณสูง จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า *K. pneumoniae* KD109 มีศักยภาพในการเป็นแหล่งผลิตเอนไซม์แมนนาเนส ซึ่งสามารถนำเอนไซม์นี้ไปประยุกต์ใช้ในการย่อยวัตถุดิบที่มีแมนแนนเป็นองค์ประกอบเพื่อนำไปใช้ประโยน์ในด้านต่าง ๆ ต่อไป

คำสำคัญ: การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ แมนแนน แมนนาเนส แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์แมนนาเนส

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเลย อำเภอเมือง จังหวัดเลย 42000
Faculty of Science and Technology, Loei Rajabhat University, Muang District, Loei Province 42000
corresponding author e-mail: kwankanit.int@lru.ac.th
Received: 23 January 2025; Revised: 25 April 2025; Accepted: 28 April 2025
DOI: https://doi.org/10.14456/lsej.2025.4

Abstract

Mannanase is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of mannan polysaccharides and has applications in diverse industries. It can be produced by various microorganisms, particularly bacteria, with each strain exhibiting unique enzymatic properties. This study aimed to select a potential mannanase-producing bacterial strain from isolates obtained from coconut residue-rich sites. In addition, identification of bacterial strain and enzyme characterization were performed. The results showed that isolate KD109 exhibited the highest enzyme activity at 1.58 U/ml. Based on 16S rRNA gene sequencing, KD109 showed over 99% sequence identity with *Klebsiella pneumoniae*. Characterization of the mannanase produced by this strain revealed that the optimum temperature of 50 °C and the optimum pH of 6. Substrate specificity analysis showed that the enzyme exhibited the highest specificity for mannan-based substrates, including konjac, followed by locust bean gum. Furthermore, this enzyme exhibited the activity on copra meal, a mannan rich by-product. This study indicated that *K. pneumoniae* KD109 could be a promising source of mannanase with potential applications in the degradation of mannan-containing raw materials for various industrial processes.

Keywords: enzyme characterization, mannan, mannanase, mannanase-producing bacteria

บทนำ

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรส่วนใหญ่เป็นวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสซึ่งมีโครงสร้างหลักประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน โดยแมนแนนเป็นพอลิแซคคาไรด์ในกลุ่มเฮมิเซลลูโลสที่พบในไม้เนื้อแข็ง ไม้เนื้ออ่อน และเมล็ดพืชตระกูลถั่ว (Dhawan & Kuar, 2007) และพบมากในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น กากมะพร้าว กากกาแฟ กากปาล์ม (Hlalukana et al., 2021) แมนแนนมีโครงสร้างแตกต่างกัน 4 ลักษณะ ได้แก่ 1) แมนแนนที่มีน้ำตาลแมนโนสเพียงชนิดเดียวในโครงสร้างหลักและไม่มีสายโซ่กิ่ง 2) กลูโคแมนแนน (glucomannan) มีโครงสร้างสายโซ่ตรงประกอบด้วยน้ำตาลแมนโนสและน้ำตาลกลูโคส และไม่มีสายโซ่กิ่ง 3) กาแลคโตแมนแนน (galactomannan) มีโครงสร้างสายโซ่ตรงประกอบด้วยน้ำตาลแมนโนส โดยมีน้ำตาลกาแลคโตสเป็นสายโซ่กิ่ง และ 4) กาแลคโตกลูโคแมนแนน (galactoglucomannan) มีโครงสร้างสายโซ่ตรงประกอบด้วยน้ำตาลแมนโนสและกลูโคส และมีสายโซ่กิ่งของน้ำตาลกาแลคโตส (Moreira & Filho, 2008; Chantorn & Piyapittayanun, 2012; Yamabhai et al., 2016; Dawood & Ma, 2020)

เอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยแมนแนน คือ เอนไซม์แมนนาเนส (mannanase) ซึ่งการย่อยแมนแนนให้ได้เป็นน้ำตาลแมนโนสและโอลิโกแซคคาไรด์นั้นถูกนำไปใช้ประโยชน์ในหลากหลายด้าน เช่น การผลิตไบโอเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส (Shukor et al., 2016; Raita et al., 2016) อุตสาหกรรมกระดาษ การใช้เอนไซม์เสริมในผลิตภัณฑ์สารซักฟอก อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม (Dawood & Ma, 2020) การปรับปรุงคุณภาพอาหารสัตว์ (Sathitkowitchai et al., 2018; Lau et al., 2022; Yaqoob et al., 2022; Liu et al., 2025) รวมไปถึงมีการใช้เอนไซม์แมนนาเนสในการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีแมนแนนสูงเพื่อผลิตเป็นแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกส์ (Jana et al., 2018; Hlalukana et al., 2021; Puengsawad et al., 2021; Kango et al., 2022; Ratnakomala et al., 2022) เนื่องด้วยความต้องการของเอนไซม์แมนนาเนสมีในปริมาณสูง ทำให้มีการคาดการณ์ว่ามูลค่าการตลาดของเอนไซม์แมนนาเนสจากทั่วโลกจะเติบโตจนมีมูลค่าประมาณ 1.5 พันล้านดอลลาร์สหรัฐภายในปี 2032 ซึ่งเพิ่มขึ้นจากประมาณ 800 ล้านดอลลาร์สหรัฐในปี 2023 (Dataintelo, 2024) เอนไซม์แมนนาเนสพบได้ในหลายแหล่ง ทั้งแบคทีเรีย ฟังไจ พืช และสัตว์ (Chauhan et al., 2012) แต่แหล่งของเอนไซม์ที่พบมากและนิยมนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมคือเอนไซม์แมนนาเนสจากแบคทีเรีย ซึ่งแบคทีเรียแต่ละชนิดมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ได้แตกต่างกัน อีกทั้งเอนไซม์แมนนาเนสที่ผลิตได้ยังมีสมบัติที่แตกต่างกันด้วย ในปัจจุบันจึงมีการค้นหาแบคทีเรียชนิดใหม่ที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพ

จากการการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจากบริเวณที่มีกากมะพร้าวเหลือทิ้ง 4 แหล่ง พบแบคทีเรียจำนวน 25 ไอโซเลต ที่มีการสร้างโซนใสบนอาหารคัดเลือกที่มีโลคัสบีนกัม ซึ่งแสดงถึงแนวโน้มในการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้ได้เลือกแบคทีเรียดังกล่าวมาศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์แมนนาเนส โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์แมนนาเนสได้สูง รวมถึงการจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรีย และศึกษาสมบัติของเอนไซม์เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์แมนนาเนส

1.1 การผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้

นำแบคทีเรียที่มีการสร้างโซนใสบนอาหารคัดเลือกที่มีโลคัสบีนกัม จำนวน 25 ไอโซเลต มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนส โดยการนำโคโลนีเดี่ยวของแต่ละไอโซเลตมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่ประกอบด้วย 0.1% yeast extract, 0.1% peptone, 0.1% NH_4NO_3, 0.14% KH_2PO_4, 0.02% $MgCl_2$ และ 1% (w/v) กากมะพร้าว (Phothichitto et al., 2006) โดยบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ และเก็บส่วน

สารละลายเอนไซม์หยาบ (crude enzyme) สำหรับนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนส ในขั้นตอนต่อไป

1.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนส

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนสโดยนำสารละลายเอนไซม์หยาบ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มกับสารละลาย 1% (w/v) โลคัสบีนกัม ที่ละลายใน 50 mM potassium phosphate buffer ที่มีพีเอช 6 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลแมนโนสที่เกิดขึ้นหลังจากการย่อยโลคัสบีนกัมด้วยวิธี 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller, 1959) โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลแมนโนส และคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนส โดย 1 ยูนิตของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารตั้งต้นให้เป็นแมนโนส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะการทดลอง

2. การจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่ศักยภาพสูงในการผลิตเอนไซม์แมนนาเนส

ศึกษาลักษณะสัณฐานและการติดสีแกรมของแบคทีเรียที่มีกิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนสสูง วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA โดยบริษัท Macrogen Inc. และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูลใน NCBI ด้วยโปรแกรม BlastN

3. การศึกษาสมบัติของเอนไซม์แมนนาเนส

3.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานและความเสถียรของเอนไซม์

ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แมนนาเนส โดยผสมสารละลายเอนไซม์หยาบ 100 ไมโครลิตร กับสารละลาย 1% (w/v) โลคัสบีนกัม 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 ถึง 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนส และศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์แมนนาเนส โดยนำสารละลายเอนไซม์หยาบไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 ถึง 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนส แสดงผลเป็นค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ (Relative activity) โดยสภาวะที่กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดคิดเป็น 100%

3.2 การศึกษาผลของพีเอชต่อการทำงานและความเสถียรของเอนไซม์

ศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานเอนไซม์ โดยผสมสารละลายเอนไซม์หยาบ 100 ไมโครลิตร กับสารละลายโลคัสบีนกัมที่มีพีเอช 3 ถึง 10 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานเอนไซม์ที่ทราบจากข้อ 3.1 เป็นเวลา 30 นาที เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนส และศึกษาความเสถียรของเอนไซม์แมนนาเนสที่พีเอช 3 ถึง 10 โดยบ่มสารละลายเอนไซม์หยาบกับบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชต่าง ๆ ได้แก่ 50 mM Sodium citrate buffer (พีเอช 3 ถึง 5) 50 mM Potassium phosphate buffer (พีเอช 6 ถึง 8) และ 50 mM Glycine-NaOH buffer (พีเอช 9 ถึง 10)

เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนส แสดงผลเป็นค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ (Relative activity) โดยสภาวะที่กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดคิดเป็น 100%

3.3 การศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น

ศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้นชนิดต่าง ๆ ได้แก่ โลคัสบีนกัม (locust bean gum) คอนยัค (konjac) กากมะพร้าว (copra meal) ไซแลน (xylan) และคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethyl cellulose; CMC) โดยเตรียมสารตั้งต้นใน 50 mM potassium phosphate buffer พีเอช 6 ทำปฏิกิริยาโดยนำสารละลายเอนไซม์หยาบ 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารตั้งต้น 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนส และแสดงผลเป็นค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ (Relative activity) โดยสภาวะที่กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดคิดเป็น 100%

ผลการวิจัย

1. การศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์แมนนาเนส

เมื่อนำแบคทีเรียที่สร้างโซนใสบนอาหารคัดเลือกที่มีโลคัสบีมกัม จำนวน 25 ไอโซเลต มาตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โดยการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนส พบว่ามีเพียงไอโซเลต KD109 ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนสสูงถึง 1.58 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (Figure 1) จึงได้คัดเลือกไอโซเลท KD109 ไปจัดจำแนกสายพันธุ์และศึกษาสมบัติของเอนไซม์ต่อไป

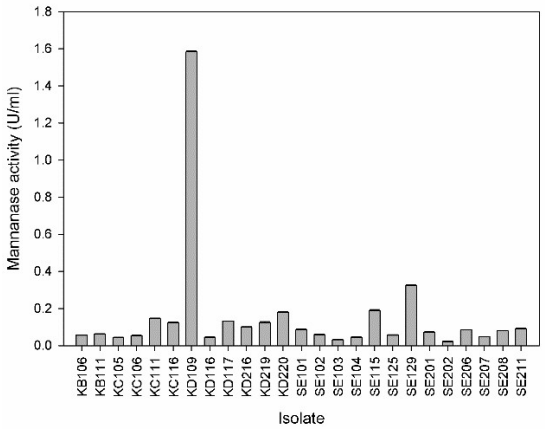

Figure 1 Mannanase activity from mannanase-producing bacteria.

2. การจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่ศักยภาพสูงในการผลิตเอนไซม์แมนนาเนส

เมื่อนำไอโซเลต KD109 มาศึกษาลักษณะสัณฐานและการติดสีแกรม พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน (Figure 2) และเมื่อนำลำดับนิวคลีไทด์ของ 16S rRNA มาวิเคราะห์กับฐานข้อมูล NCBI โดยมีความเหมือน (identity) กับ *Klebsiella pneumoniae* มากกว่า 99% โดยมีความเหมือนกับ

K. pneumoniae SS8, *K. pneumoniae* C10 และ *K. pneumoniae* NITW715076_3 ที่99.43, 99.57 และ 99.71% ตามลำดับ ดังนั้นจึงระบุให้ไอโซเลต KD109 คือ *K. pneumoniae* KD109

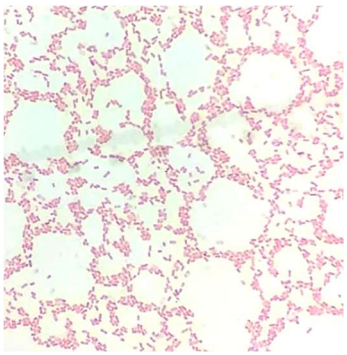

Figure 2 Gram staining of isolate KD109 under light microscope.

3. การศึกษาสมบัติของเอนไซม์แมนนาเนสจาก *K. pneumoniae* KD109

3.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานและความเสถียรของเอนไซม์แมนนาเนส

จากการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนสจาก *K. pneumoniae* KD109 ที่อุณหภูมิ 30 ถึง 80 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 50 องศาเซลเซียส เนื่องจากมีกิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนสสูงสุด โดยกิจกรรมของเอนไซม์มีแนวโน้มลดลงประมาณ 40% ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และเมื่อทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70 และ 80 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเป็นอย่างมากโดยมีกิจกรรมสัมพัทธ์เป็น 25 และ 11% ตามลำดับ (Figure 3A) นอกจากนี้จากการศึกษาความเสถียรที่อุณหภูมิต่าง ๆ พบว่าที่อุณหภูมิ 30 ถึง 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีความเสถียรสูง โดยมีกิจกรรมสัมพัทธ์มากกว่า 98% ที่สภาวะดังกล่าว อย่างไรก็ตามที่อุณภูมิสูงตั้งแต่ 60 องศาเซลเซียสเป็นต้นไปพบว่าความเสถียรของเอนไซม์ลดลงอย่างเห็นได้ชัด โดยที่อุณหภูมิ 70 และ 80 องศาเซลเซียส กิจกรรมสัมพัทธ์เหลือเพียง 15 และ 10% ตามลำดับ (Figure 3B)

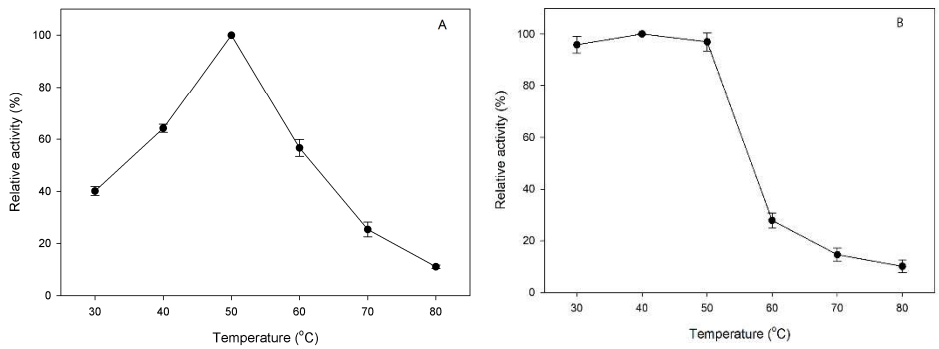

Figure 3 Effect of temperature on mannanase (A) activity and (B) stability.

3.2 การศึกษาผลของพีเอชต่อการทำงานและความเสถียรของเอนไซม์แมนนาเนส

จากการศึกษาการทำงานของเอนไซม์จาก *K. pneumoniae* KD109 ที่พีเอช 3 ถึง 10 พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ค่อนข้างต่ำในสภาวะเป็นกรดสูงที่พีเอช 3 และ 4 แต่กิจกรรมของเอนไซม์มีแนวโน้มสูงขึ้นที่พีเอช 5 และพบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 6 แสดงว่าพีเอช 6 เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ นอกจากนี้เอนไซม์มีแนวโน้มทำงานได้ลดลงเมื่อพีเอชมีค่าสูงขึ้น โดยที่พีเอช 9 และ 10 มีกิจกรรมสัมพัทธ์ 32 และ 21% ตามลำดับ (Figure 4A) และเมื่อศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ที่พีเอชต่าง ๆ พบว่าเอนไซม์มีความเสถียรต่ำที่พีเอช 3 และ 4 โดยมีกิจกรรมสัมพัทธ์น้อยกว่า 20% และเอนไซม์มีความเสถียรสูงที่พีเอช 5 และ 6 โดยมีกิจกรรมสัมพัทธ์สูงกว่า 80% และถึงแม้ว่าเมื่อพีเอชมีค่าสูงมากกว่า 6 เอนไซม์มีความเสถียรลดลง แต่เอนไซม์ยังคงกิจกรรมสัมพัทธ์สูงกว่า 60% ที่พีเอช 7 และ 8 และมีกิจกรรมสัมพัทธ์ที่พีเอช 9 และ 10 ประมาณ 50 และ 40% ตามลำดับ (Figure 4B)

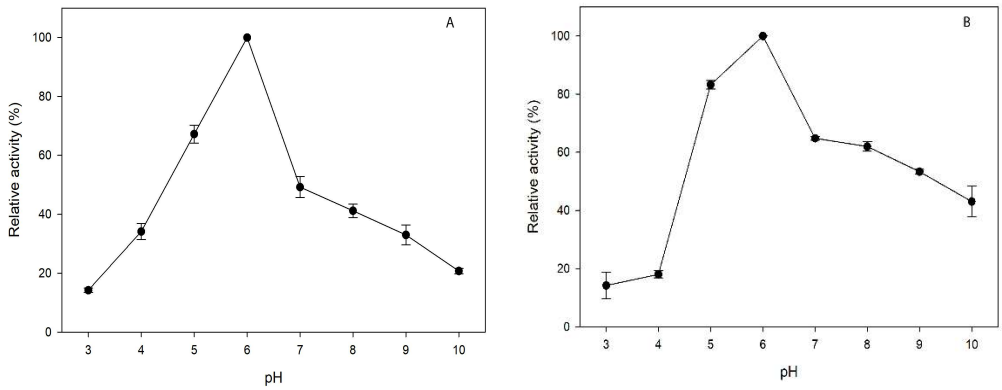

Figure 4 Effect of pH on mannanase (A) activity and (B) stability.

3.3 การศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น

เมื่อวิเคราะห์ความจำเพาะของเอนไซม์จาก *K. pneumoniae* KD109 กับสารตั้งต้นประเภทต่าง ๆ ได้แก่ โลคัสบีนกัม คอนยัค กากมะพร้าว ไซแลน และ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส พบว่าเอนไซม์มีความจำเพาะสูงกับสารตั้งต้นประเภทแมนแนน โดยมีความจำเพาะสูงสุดกับคอนยัค รองลงมาเป็นโลคัสบีนกัม โดยมีกิจกรรมสัมพัทธ์เป็น 100 และ 89.48% ตามลำดับ และเอนไซม์ยังมีความจำเพาะกับกากมะพร้าวซึ่งเป็นของเหลือทิ้งที่มีแมนแนนเป็นองค์ประกอบ โดยมีกิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 2.65% นอกจากนี้เอนไซม์จาก *K. pneumoniae* KD109 ยังแสดงกิจกรรมของเอนไซม์เมื่อใช้คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสและไซแลนซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่ไม่ใช่แมนแนน โดยมีกิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 8.30 และ 1.60% แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์จาก *K. pneumoniae* KD109 นอกจากจะมีกิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนสแล้วยังมีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสด้วย (Table 1)

Table 1 Substrate specificity of mannanase from *K. pneumoniae* KD109.

Substrate	Relative activity (%)
Konjac	100
Locust bean gum (LBG)	89.48
Carboxymethyl cellulose (CMC)	8.30
Copra meal	2.65
Xylan	1.60

อภิปรายผล

จากการนำแบคทีเรียที่มีแนวโน้มในการสร้างเอนไซม์แมนนาเนสซึ่งแยกได้จากบริเวณที่มีกากมะพร้าวเหลือทิ้งจำนวน 25 ไอโซเลต มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากมะพร้าวเพื่อเหนี่ยวนำให้สร้างเอนไซม์และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนส โดยไอโซเลต KD109 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนสสูงที่สุด คือ 1.58 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าเอนไซม์แมนนาเนสจาก *Bacillus* จากรายงานของ Phothichitto et al. (2006) และ Aekkawatchai & Chantorn (2019) แสดงให้เห็นว่าเชื้อดังกล่าวมีศักยภาพในการนำไปใช้เป็นแหล่งในการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสได้ โดยในการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจากจุลินทรีย์นั้นสามารถใช้กากมะพร้าวเป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนและเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์ได้ (Phothichitto et al., 2006; Titapoka et al., 2008; Ariandi et al., 2015; Pangsri et al., 2021) นอกจากนี้พบว่าการใช้แมนแนนชนิดอื่น เช่น โลคัสบีนกัม กากชา กากกาแฟ กากปาล์ม เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อช่วยส่งเสริมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสด้วยเช่นกัน (Olaniyi & Arotupin, 2013; Pangsri et al., 2021) ซึ่งหากมีศึกษาเพิ่มเติมถึงสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ เช่น องค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ สภาวะในการเพาะเลี้ยง ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง จะเป็นอีกกระบวนการหนึ่งที่ช่วยให้จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์สูงขึ้นและเพียงพอต่อความต้องการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานและการติดสีแกรมของไอโซเลต KD109 พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน และจากการจัดจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA พบว่ามีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *K. pneumoniae* ในฐานข้อมูล NCBI มากกว่า 99% จึงสามารถจัดจำแนกได้ว่าไอโซเลต KD109 คือ *K. pneumoniae* KD109 ซึ่งถึงแม้ว่างานวิจัยอื่น ๆ พบว่าในการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์แมนนาเนสได้ ส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกโดยเฉพาะ *Bacillus* แต่มีบางรายงานพบว่าแบคทีเรียแกรมลบในกลุ่ม *Klebsiella* สามารถผลิตเอนไซม์แมนนาเนสได้เช่นกัน เช่น *K. oxytoca* KUB-CW2-3 (Titapoka et al., 2008), *K. edwardsii* (Olaniyi & Arotupin, 2013), *K. pneumoniae* SS11 (Singh et al., 2019) และ *K. grimontii* DICP B205 (Chen et al., 2023)

เมื่อทำการศึกษาสมบัติของเอนไซม์แมนนาเนสจาก *K. pneumoniae* KD109 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์คือ 50 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับเอนไซม์แมนนาเนส จาก *K. oxytoca* KUB-CW2-3 (Titapoka et al., 2008) นอกจากนี้เอนไซม์แมนนาเนสจาก *K. pneumoniae* KD109 สามารถทำงานได้ดีและมีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงได้ดีกว่าเอนไซม์แมนนาเนสจาก *K. grimontii* DICP B2-5 ซึ่งมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานคือ 40 องศาเซลเซียส และเอนไซม์มีความเสถียรต่ำที่อุณหภูมิตั้งแต่ 45 องศาเซลเซียส (Chen et al., 2023) อย่างไรก็ตามพบว่าเอนไซม์แมนนาเนสจาก *K. pneumoniae* KD109 มีความแตกต่างจากเอนไซม์แมนนาเนสจาก *K. pneumonia* S11 ซึ่งมีรายงานว่าทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงถึง 70 องศาเซลเซียส (Singh et al., 2019) และเมื่อศึกษาผลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์พบว่าเอนไซม์แมนเนสจาก *K. pneumoniae* KD109 ทำงานได้ดีที่พีเอช 6 เช่นเดียวกับเอนไซม์แมนนาเนสจาก *K. grimontii* DICP B2-5 ต่างจากเอนไซม์แมนนาเนสจาก *K. oxytoca* KUB-CW2-3 และ *K. pneumonia* S11 ที่ทำงานได้ดีที่พีเอช 7 และ 9 ตามลำดับ (Titapoka et al., 2008; Singh et al., 2019)

นอกจากนี้เอนไซม์แมนนาเนสจาก *K. pneumoniae* KD109 มีความจำเพาะสูงต่อสารตั้งต้นประเภทแมนแนนทั้งคอนยัคซึ่งมีโครงสร้างเป็นกลูโคแมนแนน และโลคัสบีนกัมที่มีกาแลคโตแมนแนนเป็นองค์ประกอบหลัก โดยเอนไซม์มีความจำเพาะต่อคอนยัคมากกว่าโลคัสบีนกัม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์มีความจำเพาะต่อแมนแนนที่มีโครงสร้างเป็นประเภทสายตรงมากกว่าแมนแนนที่มีลักษณะเป็นกิ่ง เช่นเดียวกับเอนไซม์แมนนาเนสจาก *Bacillus subtilis* BE-91 และ *Bacillus* sp. R2AL2A (Cheng et al., 2016; Kim et al., 2018) นอกจากนี้เอนไซม์จาก *K. pneumoniae* KD109 ยังแสดงความจำเพาะต่อกากมะพร้าวซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากธรรมชาติที่มีแมนแนนเป็นองค์ประกอบในปริมาณสูง (Balasubramaniam, 1976; Pangsri, 2014) ทั้งนี้ความจำเพาะต่อกากมะพร้าวค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับคอนยัคและโลคัสบีนกัม เนื่องจากกากมะพร้าวเป็นวัตถุดิบจากธรรมชาติซึ่งมีเซลลูโลสและไขมันอยู่ในโครงสร้าง รวมถึงไม่สามารถละลายน้ำได้ ทำให้การเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์จึงเป็นไปได้ยาก อย่างไรก็ตามหากมีการศึกษาสภาวะในการย่อยที่เหมาะสม เช่น สัดส่วนของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา อาจช่วยให้เอนไซม์จาก *K. pneumoniae* KD109 สามารถย่อยกากมะพร้าวมากขึ้นได้ จากรายงานต่าง ๆ มีการใช้เอนไซม์แมนนาเนสในการย่อยวัสดุเหลือทิ้งที่มีแมนแนนสูง เช่น กากมะพร้าว กากกาแฟ ให้ได้ผลผลิตเป็นพรีไบโอติกกลุ่มแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ การใช้เอนไซม์แมนนาเนสในการปรับปรุงคุณภาพอาหารสัตว์ที่ผลิตจากกากปาล์ม รวมถึงใช้เอนไซม์แมนนาเนสในด้านอื่น ๆ มากมาย ดังนั้นเอนไซม์แมนนาเนสจาก *K. pneumoniae* KD109 ซึ่งความจำเพาะสูงต่อแมนแนนทั้งกลูโคแมนแนนและกาแลคโตแมนแนนจึงมีความน่าสนใจในการนำไปใช้ในการย่อยวัตถุดิบที่มีแมนแนนเป็นองค์ประกอบ ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือทิ้งและลดปัญหาสิ่งแวดล้อมได้

สรุปผลการวิจัย

จากงานวิจัยนี้พบแบคทีเรีย *K. pneumoniae* KD109 ซึ่งมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสได้สูงถึง 1.58 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยเอนไซม์ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 6 และมีความเสถียรที่อุณหภูมิระหว่าง 30 ถึง 50 องศาเซลเซียส และพีเอช 5 ถึง 6 นอกจากนี้เอนไซม์มีความจำเพาะสูงต่อสารตั้งต้นประเภทแมนแนน แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของ *K. pneumoniae* KD109 ในการนำใช้เป็นแหล่งของเอนไซม์แมนนาเนสเพื่อประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยราชภัฏเลยที่ให้การสนับสนุนงบประมาณในการดำเนินงานวิจัย และขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเลย ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและสถานที่ในการดำเนินงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Aekkawatchai N, Chantorn S. Effect of cultural conditions on the production of mannanase and xylanase produced by bacteria isolated from Kanchanaburi organic rice field. Burapha Science Journal 2019;24(2):768-781.

Ariandi, Yopi, Meryandini A. Enzymatic hydrolysis of copra meal by mannanase from *Streptomyces* sp. BF3.1 for the production of mannooligosaccharides. HAYATI Journal of Biosciences 2015;22(2):79-86.

Balasubramaniam K. Polysaccharides of the kernel of maturing and mature coconuts. Journal of Food Science 1976;41:1370-1373.

Chantorn S, Piyapittayanun C. Production and application of microbial mannanases. Thai Science and Technology Journal 2012;20(4):365-377.

Chauhan PS, Puri N, Sharma P, Gupta N. Mannanases: Microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications. Applied Microbiology and Biotechnology 2012;93:1817-1830.

Chen C, Li K, Li T, Li J, Liu Q, Yin, H. Identification and characterization of a novel mannanase from *Klebsiella grimontii*. Bioengineering 2023;10(10):1230.

Cheng L, Duan S, Feng X, Zheng K, Yang Q, Liu Z. Purification and characterization of a thermostable β-mannanase from *Bacillus subtilis* BE-91: Potential application in inflammatory diseases. Hindawi Publishing Corporation 2016;2016:6380147.

Dataintelo. Mannanase Market. Available at: https://dataintelo.com/report/global-mannanase-market. 2024. Accessed January 9, 2025.

Dawood A, Ma K. Application of microbial β-mananases. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2020;8:598630.

Dhawan S, Kaur J. Microbial mannanases: An overview of production and applications. Critical Reviews in Biotechnology 2007;27:197-216.

Moreira LRS, Filho EXF. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. Applied Microbiology and Biotechnology 2008;79:165-178.

Hlalukana N, Magengelele M, Malgas S, Pletschke BI. Enzymatic conversion of mannan-rich plant waste biomass into prebiotic mannooligosaccharides. Foods 2021;10(9):2010.

Jana UK, Suryawanshi RK, Prajapati BP, Soni H, Kango N. Production optimization and characterization of mannooligosaccharide generating β-mannanase from *Aspergillus oryzae*. Bioresource Technology 2018;268:308-314.

Kango N, Jana UK, Choukade R, Nath S. Advances in prebiotic mannooligosaccharides. Current Opinion in Food Science 2022;47:100883.

Kim S, Lee MH, Lee ES, Nam YD, Seo DH. Characterization of mannanase from *Bacillus* sp., a novel *Codium fragile* cell wall-degrading bacterium. Food Science and Biotechnology 2018;27(1):115-122.

Lau SYL, Halim MA, Telajan ERAD, Ling CMV. *Emericella nidulans* (4DP5), *Cladosporium herbarum* (7DF12) and *Bacillus subtilis* improve the nutritional value of palm kernel cake (PKC) through solid-state fermentation (SSF). *Malaysian Journal of Microbiology* 2022;18(4):455-462.

Liu Y, Liu Y, Cao Y, Wang C. Pretreatment of palm kernel cake by enzyme-bacteria and its effects on growth performance in broilers. Animals 2025;15(2):116

Miller GL. Use of dinitrosalicyclic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry 1959;31:426-428.

Olaniyi OO, Arotupin DJ. Isolation and screening of mannanase producing bacteria from agricultural waste. British Microbiology Research Journal 2013;3(4):654-663.

Pangsri P. Characterization of mannanase from *Bacillus circulans* NT 6.7 and its application in mannooligosaccharides preparation. Doctor of Philosophy (Biotechnology), Graduate School, Kasetsart University; 2014

Pangsri P, Wuttipornpun T, Songserm W. Mannanase and cellulase production from agricultural waste by *Bacillus subtilis* P2-5 strain. Applied Science and Engineering Progress 2021;14(3):425-431.

Phothichitto K, Nitisinprasert S, Keawsompong S. Isolation, screening and identification of mannanase producing microorganisms. Kasetsart Journal (Natural Science) 2006;40:26-38.

Puengsawad P, Piyapittayanun C, Sawangwan T, Chantorn S. Characterization of *Bacillus subtilis* GA2(1) mannanase expressed in *Escherichia coli* Rosetta (DE3) for enzymatic production of manno-oligosaccharides from spent coffee grounds and *in vitro* assessment of their prebiotic properties. Agriculture and Natural Resources 2021;55:319-330.

Raita M, Ibenegbu C, Champreda V, Leak DJ. Production of ethanol by thermophilic oligosaccharide utilising *Geobacillus thermoglucosidasius* TM242 using palm kernel cake as a renewable feedstock. Biomass and Bioenergy 2016;95:45–54.

Ratnakomala S, Kahar P, Kashiwagi N, Lee J, Kudou M, Matsumoto H, et al. Manno-oligosaccharide production from biomass hydrolysis by using Endo-1,4-β-Mannanase (ManNj6-379) from *Nonomuraea jabiensis* ID06-379. Processes 2022;10:269.

Sathitkowitchai W, Nitisinprasert S, Keawsompong S. Improving palm kernel cake nutrition using enzymatic hydrolysis optimized by Taguchi method. 3 Biotech 2018;8:407.

Shukor H, Abdeshahian P, Al-Shorgani NKN, Hamid AA, Rahman NA, Kalil MS. Saccharification of polysaccharide content of palm kernel cake using enzymatic catalysis for production of biobutanol in acetone-butanol-ethanol fermentation. Bioresource Technology 2016;202:206-213.

Singh S, Singh G, Khatri M, Kaur A, Arya SK. Thermo and alkali stable β-mannanase: Characterization and application for removal of food (mannans based) stain. International Journal of Biological Macromolecules 2019;134(1):536-546.

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;24:1425-1433.

Yamabhai M, Sak-Ubol S, Srila W, Haltrich D. Mannan biotechnology: from biofuels to health. Critical Reviews in Biotechnology 2016;36(1):32-42.

Yaqoob MU, Yousaf M, Khan MI, Wang M. Effect of β-Mannanase supplementation on growth performance, ileal digestibility, carcass traits, intestinal morphology, and meat quality in broilers fed low-ME diets. Animals 2022;12(9):1126.