

碳氮源对枯草芽孢杆菌发酵产 β -甘露聚糖酶的影响*龚劲松¹,李恒¹,刘恒霞¹,陆震鸣¹,蒋敏¹,罗春勤²,许正宏¹,史劲松¹

1(江南大学药学院,江苏无锡,214122) 2(永安缘和生物科技有限公司,四川成都,611630)

摘 要 为提高枯草芽孢杆菌产甘露聚糖酶的能力,对 *Bacillus subtilis* YH12 产 β -甘露聚糖酶的培养基组分和培养条件进行了优化,重点考察了碳氮源对发酵产酶的影响。实验结果表明,以魔芋精粉和甘露寡糖作为碳源时能对菌株发酵产酶起到良好的诱导作用,魔芋甘露寡糖的诱导效果要优于魔芋精粉,从经济效益角度考虑选择魔芋精粉作为碳源和诱导底物;以胰蛋白胨作为发酵氮源时产酶效果最佳。研究同时发现,产酶的最佳碳氮比为 2:1;Na⁺、K⁺ 和 Mg²⁺ 对酶活具有显著促进作用;对发酵条件的考察结果显示,选择初始 pH 和培养温度分别为 7.5 和 30 ℃ 时产酶效果最好。产酶发酵过程及 SDS-PAGE 分析表明,发酵 33 h 时产酶量达到最高。在此条件下 *B. subtilis* YH12 发酵产酶高峰期 β -甘露聚糖酶活力达到 280 U/mL,相比初始水平提高约 5 倍。

关键词 枯草芽孢杆菌; β -甘露聚糖酶;诱导;发酵条件;碳氮源

β -甘露聚糖酶(EC3.2.1.78)是能将甘露聚糖降解成低聚甘露糖和甘露糖的一类酶的总称,其来源广泛,在植物、动物及微生物体内均有发现^[1-3]。微生物来源的 β -甘露聚糖酶因具备发酵周期短、酶活高、制备成本低、来源稳定、提取方便等优势,已在饲料、食品、纺织、造纸等生产和理论研究中得到了广泛的应用^[1,4]。

国内外对 β -甘露聚糖酶发酵的研究主要集中于芽孢杆菌(*Bacillus*)和黑曲霉(*Aspergillus*),在芽孢杆菌中研究较多的为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)和嗜碱芽孢杆菌(*Alkalophilic Bacillus* sp.) 3 种^[5]。由于 β -甘露聚糖酶的酶活水平普遍较低,这是限制其实际生产应用的主要因素,因此,提升 β -甘露聚糖酶的发酵产量显得尤为重要。提高酶产量的最直接的方法就是对培养基及培养条件进行优化,发酵条件不仅影响菌体的生长繁殖,还影响酶的合成^[6]。曲丽娜等人^[7]通过发酵优化将 1 株高产 β -甘露聚糖酶的优良菌株 *Bacillus* sp. QYW-1 酶活由初始的 21.85 U/mL 提升至 233.86 U/mL。武志芳等人^[8]采用平板划线及摇瓶复筛等多步策略成功筛选获得 2 株高产 β -甘露聚糖酶的细菌菌株,分别鉴定为芽孢杆菌 B2 和阴沟肠杆菌 E1,经过初步发酵优化,其

酶活力可达 29.98 U/mL 和 11.84 U/mL。

课题组针对前期获得的 1 株表现出较高甘露聚糖酶活力的枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* YH12 进行初步表征发现,该菌株所产甘露聚糖酶具有良好的热稳定性和甘露聚糖底物水解性能,并且表现出较独特的底物谱,对带支链的复杂底物水解性能高于简单底物,具有良好的应用前景。鉴于该酶在酶学性质上所具有的优势,为了进一步提高其工业应用潜力,本研究对该枯草芽孢杆菌产 β -甘露聚糖酶的发酵条件进行优化,以酶活为参考指标,重点研究了碳氮源对发酵产酶的影响,同时考察了培养基初始 pH、温度等对甘露聚糖酶表达的影响,以期获得最佳发酵产酶配方,同时获得高活力的 β -甘露聚糖酶。

1 材料与方法

1.1 菌种与培养基

实验所采用菌株 YH12 由成都市永安缘和生物科技有限公司保藏,菌株培养于 LB 斜面培养基,置于 4 ℃ 保存;菌种活化培养基(g/L):蛋白胨 10,牛肉膏 5,NaCl 5,琼脂 20;种子培养基(g/L):蛋白胨 10,牛肉膏 5,NaCl 5;发酵培养基(g/L):魔芋精粉 2,蛋白胨 0.5, K₂HPO₄ 0.5, NaNO₃ 0.5, MgSO₄ · 7H₂O 0.02;灭菌条件:121 ℃ 高压灭菌 20 min。

1.2 主要试剂

刺槐豆胶购自 Sigma 公司,魔芋精粉、瓜豆胶、蚕豆胶、黄原胶、卡拉胶等由永安缘和生物科技有限公司提供。琼脂、牛肉膏、蛋白胨及其他培养基组分均

第一作者:工学博士,讲师(史劲松教授为通讯作者, E-mail: shijs@163.com)。

* 江苏省产学研前瞻性联合研究项目(BY2012062);十二五国家科技支撑计划项目(2012BAD33B06)

收稿日期:2015-06-11,改回日期:2015-07-08

购自国药集团化学试剂有限公司。细菌基因组 DNA 制备试剂盒购自海捷瑞生物有限公司,其他试剂均为国产分析纯和化学纯。

1.3 发酵培养

斜面活化:无菌超净台条件下,取保存于斜面的纯化菌种 1 环,接种于活化平板培养基上,37 ℃ 静置培养 24 h 后,观察菌体生长情况。

种子培养:挑单菌落于三角瓶液体培养基(50 mL/250 mL)中,37 ℃、200 r/min 下振荡培养 12 h,作为种子液。

发酵产酶:采用三角瓶摇瓶产酶,按 2% 的接种量,将种子液接到发酵培养基中(50 mL/250 mL),于 37 ℃、200 r/min 条件下振荡培养,在不同时间点取样,4 ℃ 下 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液进行酶活检测。

1.4 β -甘露聚糖酶活力测定

采用 DNS 法进行测定。DNS 试剂配制:称取酒石酸钠钾 122.2 g,溶于 250 mL 去离子水中,溶解煮沸,于热溶液中依次加入 3,5-二硝基水杨酸 3.15 g、NaOH 10.5 g、苯酚 2.5 g、Na₂SO₃ 2.5 g,搅拌至溶解,冷却后定容至 500 mL 容量瓶中,贮存于棕色瓶备用。底物溶液配制:准确称取 0.5 g 刺槐豆胶溶于 100 mL 50 mmol/L 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(pH 6.5)。

酶活测定:参照 Turner 等人^[9]的方法,在 10 mL 具塞比色管中,加入 0.9 mL 5 g/L 的底物刺槐豆胶溶液,预热至 55 ℃。添加 0.1 mL 经适当稀释的粗酶液(空白为经过煮沸失活的粗酶液),在 55 ℃ 下反应 10 min。反应完全后,向各管加入 1 mL DNS 试剂,置沸水浴 5 min 显色。取出冷却并定容至 10 mL,检测在 540 nm 波长处的吸光值。

β -甘露聚糖酶活力定义为:上述反应条件下,5 g/L 刺槐豆胶底物每分钟释放出 1 mmol 相当于还原糖所需要的酶量为 1 个酶活力单位(U)。

1.5 发酵培养基组分优化

1.5.1 碳源对产酶的影响

在产酶培养基的基础上,其他培养条件不变,碳源质量浓度 20 g/L,分别考察 11 种碳源(魔芋精粉、魔芋飞粉、甘露寡糖、香豆胶、黄原胶、可溶性淀粉、槐豆胶、瓜儿豆胶、阿拉伯胶、麦芽糖、葡萄糖)对产酶的影响。以最佳碳源作为唯一碳源,考察不同添加质量浓度(10~50 g/L),每 5 g/L 为 1 个梯度)对发酵产酶的影响。上述实验每个水平均进行 3 个重复,根据酶活高低确定最佳碳源及质量浓度。

1.5.2 氮源对产酶的影响

最佳碳源及碳源质量浓度确定后,选择不同的有机氮源或无机氮源作为唯一氮源,质量浓度为 5 g/L 分别考察不同氮源对产酶的影响。分别选用 9 种氮源(酵母提取物、牛肉膏、大豆蛋白胨、玉米浆、胰蛋白胨、磷酸氢二铵、硝酸钠、尿素、氯化铵)考察对产酶的影响。固定其余组分条件不变,每个水平进行 3 个重复,根据酶活高低确定最佳氮源。

1.5.3 碳氮比对产酶的影响

最佳氮源确定后,将其作为唯一氮源并改变其浓度,设置碳氮比为 1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1 共 6 个比例梯度,考察不同碳氮比对产酶的影响。固定其余组分条件不变,每个水平进行 3 个重复,根据酶活高低确定最佳碳氮比。

1.5.4 金属离子对产酶的影响

在以上条件基础上,通过改变 Na⁺、K⁺、Mg²⁺、Zn²⁺ 质量浓度(0~10 g/L),观察这 4 种金属离子对产酶的影响。固定其余组分条件不变,每个水平进行 3 个重复,根据酶活高低确定最佳金属离子及其质量浓度。

1.6 发酵培养条件优化

1.6.1 初始 pH 值对产酶的影响

产酶培养基组分确定后,用柠檬酸和氢氧化钠溶液调节培养基的初始 pH 值(5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0)。固定其余组分条件不变,每个水平进行 3 个重复。待发酵后测定酶活力,根据酶活高低确定最佳的初始 pH 值。

1.6.2 培养温度对产酶的影响

采用不同温度(20、25、30、35、40、45 ℃)进行发酵培养。固定其余组分条件不变,每个水平进行 3 个重复。待发酵后测定酶活力,根据酶活高低确定最佳的培养温度。

1.7 枯草芽孢杆菌产酶的动态时间曲线

在产酶培养基组分及培养条件确定的基础上,对枯草芽孢杆菌产 β -甘露聚糖酶的过程进行研究。每隔 3 h 取样,测定其酶活及蛋白质浓度。以时间为横坐标,酶活力及蛋白质质量浓度为纵坐标绘制产酶的动态时间曲线。

2 结果与讨论

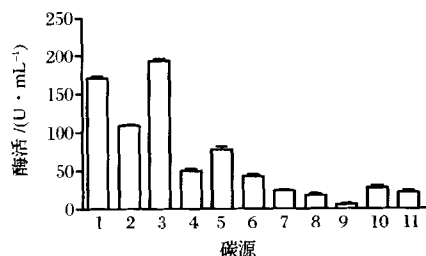
2.1 培养基组分优化

2.1.1 不同碳源对产酶的影响

目前已报道的多数甘露聚糖酶通常需要外源底

物的诱导,一般只有在培养基中添加甘露聚糖时才能合成 β -甘露聚糖酶^[10-11],因而培养基碳源既要为菌体生长提供充足的营养,又需对产酶起到诱导作用。本实验选择了含有不同类型的甘露聚糖底物,如富含葡甘聚糖的魔芋精粉和魔芋飞粉,含有半乳甘露聚糖的香豆胶和瓜儿豆胶等,此外还选择了与甘露聚糖结构相近的阿拉伯胶和黄原胶等高分子多糖作为碳源。

由图1看出,以魔芋精粉和甘露寡糖作为碳源时对产酶诱导效果最好,酶活均接近200 U/mL,魔芋甘露寡糖要优于魔芋精粉,但从经济效益角度考虑,魔芋甘露寡糖较为昂贵,不适合作为大生产的原料。魔芋飞粉的主要成分虽然也是葡甘聚糖,但含有400 g/L左右的淀粉,是魔芋加工中的副产物,虽然其诱导作用低于魔芋精粉,但其价格相对低廉,在未来工业生产中具有一定的竞争力。与葡甘聚糖底物相比,半乳甘露聚糖类型的豆胶类物质的诱导效果较差,与黄原胶、阿拉伯树胶等其他碳源基本相似。因而,作为发酵培养基的碳源,应优先选择富含葡甘聚糖的底物。最终魔芋精粉被选为最适碳源用于后续研究。



1 - 魔芋精粉; 2 - 魔芋飞粉; 3 - 魔芋甘露低聚糖; 4 - 香豆胶; 5 - 槐豆胶; 6 - 瓜儿豆胶; 7 - 黄原胶; 8 - 阿拉伯胶; 9 - 可溶性淀粉; 10 - 蔗糖; 11 - 葡萄糖

图1 不同碳源对菌株 YH12 产酶的影响

Fig. 1 Effect of carbon sources on β -mannanase production

2.1.2 碳源质量浓度对产酶的影响

碳源质量浓度对于发酵产酶也存在较大影响,选择合适的质量浓度不仅可以提高酶的产量,同时从工业生产过程的经济性角度考虑也是必需的。实验表明,魔芋精粉质量浓度在10~40 g/L范围内时,产酶量随着浓度的增加而升高(图2)。较高的碳源浓度有利于菌体的生长,但当魔芋精粉质量浓度达到40 g/L后,菌株 YH12 产酶能力开始缓慢下降。分析其原因在于魔芋精粉质量浓度的提高,使培养基黏度迅速增大,近乎凝胶状,影响了发酵液的流动性,其传质与溶氧受到限制。芽孢杆菌是好氧菌,当供氧不足时

其生长受到抑制,直接导致产酶量的降低。同时,过量的碳源供应也会引起营养阻遏,微生物不再向胞外分泌过量的水解酶,这是微生物细胞具有环境适应性和代谢经济性的体现。

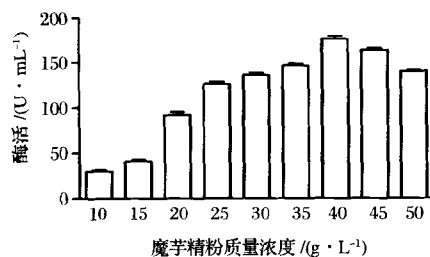
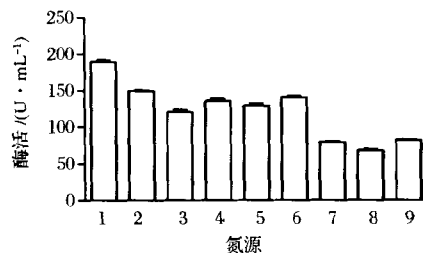


图2 魔芋精粉浓度对菌株产酶的影响

Fig. 2 Effect of konjac powder concentrations on β -mannanase production

2.1.3 不同氮源对产酶的影响

由图3看出,不同类型氮源对菌株 YH12 产甘露聚糖酶具有较大影响,有机氮源普遍较高,其中胰蛋白胨效果最好,玉米浆次之。无机氮源中的尿素也具有较好的产酶效果,基本接近于酵母粉和牛肉膏。通常,有机氮含有不同结构的碳架,这些物质可提供较多的合成前体,营养全面,菌体生长旺盛。而无机氮结构较简单,易于被菌体利用,是速效型氮源,在培养基中被消耗完后,发酵液中的 pH 会降低,酸碱条件的改变会对酶的合成造成一定影响^[12]。因此对于该酶的表达合成,选择有机氮源胰蛋白胨作为氮源相对较为理想。



1 - 胰蛋白胨; 2 - 玉米浆; 3 - 大豆蛋白胨; 4 - 酵母粉; 5 - 尿素; 6 - 牛肉膏; 7 - 硝酸钠; 8 - 磷酸二氢铵; 9 - 氯化铵

图3 不同氮源对菌株产酶的影响

Fig. 3 Effect of nitrogen sources on β -mannanase production

2.1.4 碳氮比对产酶的影响

采用40 g/L的魔芋精粉为碳源,不同浓度蛋白胨为氮源,考察在不同碳氮比添加的情况下菌株 YH12 的产酶情况(图4)。

在碳氮比为2:1时,产酶活力达到248 U/mL;随

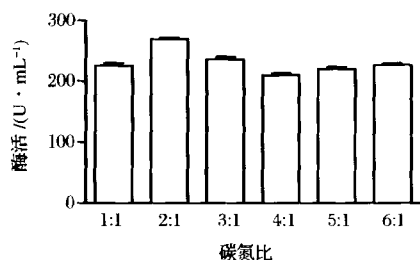


图4 不同碳氮比对菌株产酶的影响

Fig. 4 Effect of the ratio carbon to nitrogen source on β -mannanase production

随着碳氮比的升高,产酶水平出现下降的趋势,显示出碳氮比对菌体产酶具有极其显著的影响。氮源不足

时,菌体生物量较低,使酶的产量受到影响,而较高浓度的氮源使菌体生长过于旺盛,反而不利于 β -甘露聚糖的诱导分泌。因此,在产酶培养基中,保持合适的碳氮比对于产酶显得尤为重要。

2.1.5 金属离子对产酶的影响

无机盐是菌体生长繁殖的必需成分之一。在前期实验基础上,实验研究了 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 4种离子不同浓度对菌株产酶的影响(图5)。实验发现,2.5 g/L 质量浓度的 Na^+ 、7.5 g/L K^+ 和5.0 g/L Mg^{2+} 对酶活促进作用较大。而 Zn^{2+} 存在则会严重抑制菌株产酶,并且随着 Zn^{2+} 浓度的不断升高,其抑制作用会加强。

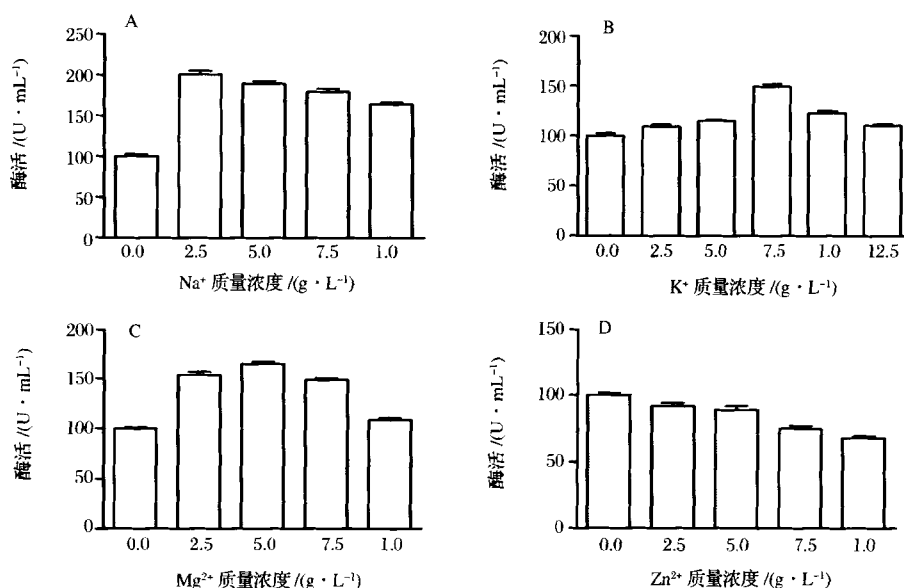


图5 不同金属离子对产酶的影响

Fig. 5 Effect of the metal ions on β -mannanase production

2.2 培养条件对发酵产酶的影响

2.2.1 初始 pH 值对产酶的影响

在菌体发酵过程中,环境 pH 值对发酵产酶的影响较为复杂。环境 pH 值不仅可以改变菌体新陈代谢速度,还可影响菌体代谢方式,因而在发酵过程中,控制适宜的培养基 pH 对菌体生长及产物合成具有重要作用^[13]。由图6看出,初始 pH 在 7.0~8.0 有利于产酶;且 pH 在 5.0~7.5 这一范围里,产酶量随着 pH 值的升高而增加,在 pH 7.5 时产酶达到最高,为 243 U/mL;随着 pH 继续增高,菌体产酶呈现缓慢下降趋势。分析原因为发酵液的碱性对菌体生长不利,同时碱性环境对酶活具有一定抑制作用。

2.2.2 培养温度对产酶的影响

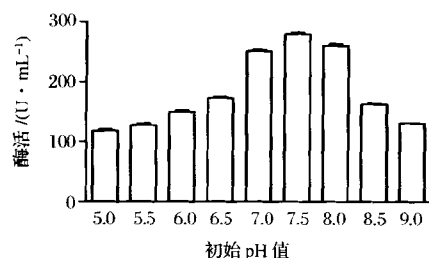


图6 初始 pH 对菌株 YH12 产酶的影响

Fig. 6 Effect of pH on β -mannanase production

温度可影响到酶产量及活性,因此控制好培养温度对于发酵具有重要作用^[14]。结果表明在 20~45 °C 范围内,酶活具有先上升后下降的趋势(图7)。

在 30℃ 时,菌体产酶量最高,总酶活为 267 U/mL。当温度升至 45℃ 时,酶活开始大幅下降,表明达到这一温度时可能对菌体生长不利以及使酶变性失活。酶活及产酶的最适温度接近于枯草芽孢杆菌的最适生长温度,在甘露聚糖酶的工业生产中可降低生产线控温的成本。

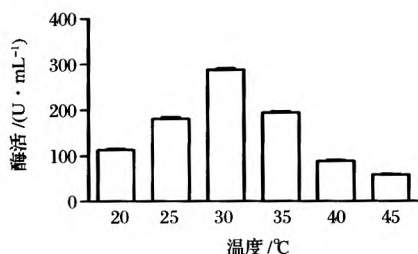


图 7 培养温度对产酶的影响

Fig. 7 Effect of temperature on β -mannanase production

2.3 发酵产酶过程曲线

在发酵培养基组分及条件优化的基础上,本实验研究了菌体的发酵产酶过程。如图 8 所示,在 0 ~ 33 h 内,发酵液的酶活及蛋白浓度持续升高,并在 33 h 时酶活达到最高。随着发酵继续进行,酶活及蛋白质浓度表现出下降趋势。同时,SDS-PAGE 分析结果显示(图 9),从 12 h 开始发酵液中能检测出明显目的蛋白,随着时间的延长蛋白量逐渐增加;但从 36 h 起,酶的条带逐渐出现降解,至 50 h 后,酶蛋白条带已无法在 SDS-PAGE 上检出。至发酵后期,枯草芽孢杆菌会产生大量芽孢,伴随着芽孢的形成与菌体的自溶,菌体中一些内源性蛋白酶的释放,可能是导致甘露聚糖酶快速失活的重要原因。因此,为避免发酵后期酶的损失,应在 30 ~ 36 h 内完成发酵并进行菌体分离。

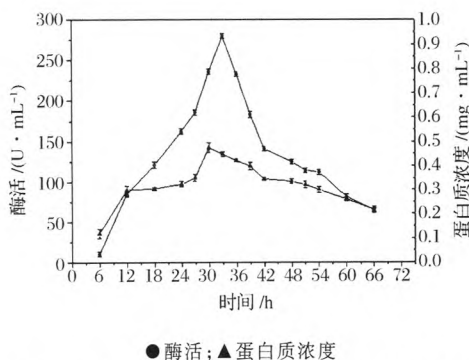


图 8 菌株 YH12 产甘露聚糖酶发酵过程曲线

Fig. 8 Time course of β -mannanase production from *B. subtilis* YH12

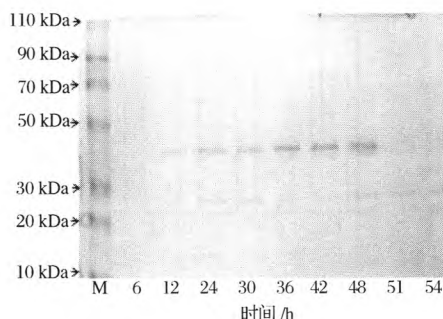


图 9 发酵上清液蛋白质 SDS-PAGE 图谱

Fig. 9 Time course of β -mannanase production by SDS-PAGE analysis

3 结论

对 *B. subtilis* YH12 产甘露聚糖酶的培养基组分及培养条件进行了优化。甘露聚糖酶属于一类诱导型酶,对其发酵培养基碳源进行优化时,从酶活和工业生产成本角度考虑,选择魔芋精粉作为碳源底物;对发酵液的氮源进行优化时,以胰蛋白胨作为氮源效果最好,同时发现产酶的最佳碳氮比为 2:1。该菌株在初始 pH = 7.5 和温度为 30℃ 时产酶效果最好。在此基础上,研究了菌体的生长及发酵产酶过程,发酵 33 h 时产酶量达到最高。经过优化后,菌体的酶活从初始的 55 U/mL 提高到 280 U/mL 左右,提高了 5 倍,优化效果明显。但随发酵时间延长,伴随着芽孢的形成与菌体的自溶,甘露聚糖酶快速失活。因此选择最佳的发酵终止时间对于工业生产尤为重要。本研究可为工业化生产 β -甘露聚糖酶提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] 赵月菊,薛燕芬,马延和. β -甘露聚糖酶的结构生物学研究现状和展望[J]. 微生物学报, 2009, 49(9): 1131 - 1137.
- [2] 唐存多,李剑芳,邹敏辰,等. β -甘露聚糖酶末端残基变体对其酶学特性的影响[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2013, 29(7): 655 - 660.
- [3] Lv J, Chen Y, Pei H, et al. Cloning, expression, and characterization of β -mannanase from *Bacillus subtilis* MAFIC-S11 in *Pichia pastoris*[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2013, 169(8): 2326 - 2340.
- [4] 许牡丹,杨伟东,许宝红,等. 微生物 β -甘露聚糖酶的制备与应用研究进展[J]. 动物医学进展, 2006, 27(9): 31 - 34.

- [5] Chauhan P, Puri N, Sharma P, et al. Mannanases: microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 93 (5): 1 817 - 1 830.
- [6] WANG Meng-fan, YOU Sheng-ping, ZHANG Shuai-shuai, et al. Purification, characterization, and production of β -mannanase from *Bacillus subtilis* TJ-102 and its application in gluco-mannooligosaccharides preparation [J]. Eur Food Res Technol, 2013, 237 (3): 399 - 408.
- [7] 曲丽娜, 王瑞明, 肖静, 等. β -甘露聚糖酶高产菌株发酵条件优化[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38 (12): 64 - 69.
- [8] 武志芳, 张霞, 张胜潮, 等. β -甘露聚糖酶产生菌的筛选及酶学性质研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22 (10): 2 515 - 2 517.
- [9] Turner P, Mamo G, Karlsson E. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining[J]. Microb Cell Fact, 2007, 6 (1): 9.
- [10] FENG Yao-yu, HE Zhi-min, SONG LF, et al. Kinetics of β -mannanase fermentation by *Bacillus licheniformis* [J]. Biotechnol Lett, 2003, 25 (14): 1 143 - 1 146.
- [11] 冯娜, 赵君, 赵敏. β -甘露聚糖酶产生菌 DY-14 的发酵优化及分离纯化[J]. 黑龙江医药, 2011, 24 (3): 397 - 401.
- [12] 冯娜. 枯草芽孢杆菌产 β -甘露聚糖酶的发酵优化、纯化及性质的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2011.
- [13] 张建新, 赵杰, 陈泽田, 等. 产 β -甘露聚糖酶内生菌的诱变育种及产酶条件优化[J]. 基因组学与应用生物学, 2014, 33 (4): 815 - 821.
- [14] 王梅, 石璟, 江丽华, 等. 1 株产 β -甘露聚糖酶的菌株筛选鉴定和产酶条件初步优化[J]. 吉林农业大学学报, 2014, 36 (4): 411 - 415.

Effects of carbon and nitrogen sources on β -mannanase production from *Bacillus subtilis*

GONG Jin-song¹, LI Heng¹, LIU Heng-xia¹, LU Zhen-ming¹,
JIANG Min¹, LUO Chun-qin², XU Zheng-hong¹, SHI Jin-song¹

1 (School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

2 (Yongan Yuanhe Biotechnology Co., Ltd., Chengdu 611630, China)

ABSTRACT In order to improve the β -mannanase production from *Bacillus subtilis* YH12, the effect of medium components and culture conditions on fermentation was investigated, especially the carbon and nitrogen sources. Results showed that moderate induction effect was observed with the konjacmannan oligosaccharide and konjac flour as the carbon source. Although konjacmannan oligosaccharide showed better improvement effect on enzyme formation than konjac flour, the latter was selected as the preferred carbon source and induction substrate due to its relatively high economic efficiency. Moreover, the tryptone was determined to be the optimum nitrogen source and meanwhile the optimal carbon-nitrogen ratio was 2:1. Na^+ , K^+ , and Mg^{2+} significantly improved the β -mannanase production. The investigations on culture conditions showed an optimal culture pH and temperature of 7.5 and 30 °C. The maximum activity was achieved at 33 h through the fermentation curve and SDS-PAGE. Based on these data, the β -mannanase production reached up to 280 U/mL, which was increased by 5-fold compared with the initial level.

Key words *Bacillus subtilis*; β -mannanase; induction; fermentation conditions; carbon and nitrogen sources