

李 辉,翟颖超,施振旦. 重组猪抑制素的高密度发酵生产条件优化[J]. 江苏农业科学,2015,43(8):207-210.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.08.068

重组猪抑制素的高密度发酵生产条件优化

李 辉,翟颖超,施振旦

(江苏省农业科学院畜牧研究所/江苏省农业科学院动物品种改良和繁育重点实验室,江苏南京 210014)

摘要:抑制素(INH)是性腺组织分泌的一种糖蛋白,可通过抑制促卵泡素分泌和性腺组织发育,在动物繁殖活动中起着重要的调控作用。通过对 INH α 亚基免疫,中和动物体内的 INH,可解除 INH 对动物繁殖活动的抑制作用,从而提高动物的繁殖力。为获得大量重组的 INH α 亚基蛋白,满足生产的需要,本研究对发酵罐高密度发酵工艺进行探索,并分别对发酵培养基的类型、乳糖诱导浓度、诱导时间进行优化。结果表明,采用 TB 培养基发酵至 20 h,菌体 $D_{600\text{ nm}}$ 值达到最大,为 22.84,菌体总湿质量为 25.48 g/L,显著高于其他 2 种培养基,综合比较细菌生长趋势、菌体总湿质量以及培养基成本等因素,TB 培养基较适用于重组 INH 的发酵罐生产;终浓度为 10 g/L 的乳糖诱导 5 h 可达到最高蛋白表达量,占菌体总蛋白的 50% 以上,发酵结束时 $D_{600\text{ nm}}$ 值达到 36,细菌总湿质量达到 28.66 g/L。

关键词:抑制素;高密度发酵;乳糖诱导;发酵罐

中图分类号: TQ920.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)08-0207-04

抑制素(inhibin,INH)是由性腺组织(卵巢、睾丸)分泌的糖蛋白激素,由 α 、 β 亚基通过二硫键连接形成异源二聚体^[1-2]。其中 α 亚基为 INH 独有, β 亚基则与激活素(activin)共用,2 个 β 亚基通过二硫键组成同源二聚体,即为 activin^[2-3]。INH 具有抑制促卵泡素(FSH)分泌的功能^[4],还具有直接抑制性腺发育及其功能的作用^[5]。因此,主动或

被动免疫 INH α 亚基,中和动物体内 INH 的生物活性,可促进垂体分泌 FSH,解除 INH 对性腺功能的抑制,最终缓解 INH 对动物生殖活动的抑制作用,促进动物繁殖活动。前期研究证实,主动或被动免疫 INH α 亚基可以显著提高羊、猪、牛、水牛等动物的发情表现、排卵数、卵子质量、受胎率、产仔数^[6-10]。对蛋鸡免疫也起到类似作用,主要表现在显著提高其产蛋率^[11]。对公畜进行 INH α 亚基免疫同样会产生积极作用,主要表现在性成熟提前、睾丸质量和体积增加、精子产生量增加和质量提高等^[12-13]。江苏省农业科学院动物品种改良和繁育重点实验室进一步研究发现,免疫 INH α 亚基对夏季高温应激导致的母畜乏情和公畜精子质量下降、母畜产后乏情以及提高种畜的使用年限等具有显著效果^[12]。综上,笔者认为重组 INH 在畜牧业生产中具有较广泛的应用前景,并蕴藏着可观的商业价值。

收稿日期:2014-09-01

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号: CX(13)5039]。

作者简介:李 辉(1982—),男,山东惠民人,博士,助理研究员,主要从事动物繁殖与分子生物学研究。Tel: (025)84390772;E-mail: lhlydk@126.com。

通信作者:施振旦,博士,研究员,主要从事动物繁殖学研究。Tel: (025)84390956;E-mail: zdshi@scau.edu.cn。

蛋白发生特异性反应,制备的多抗血清具有很好的特异性,可作为检测用抗体进一步用于 DHAV-1 3C 抗原的检测及功能研究。

参考文献:

- [1] Wang L, Pan M, Fu Y, et al. Classification of duck hepatitis virus into three genotypes based on molecular evolutionary analysis[J]. Virus Genes, 2008, 37(1): 52-59.
- [2] Tseng C H, Knowles N J, Tsai H J. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 indicates that it should be assigned to a new genus[J]. Virus Research, 2007, 123(2): 190-203.
- [3] Tseng C H, Tsai H J. Sequence analysis of a duck picornavirus isolate indicates that it together with porcine enterovirus type 8 and simian picornavirus type 2 should be assigned to a new picornavirus genus[J]. Virus Research, 2007, 129(2): 104-114.
- [4] Kim M C, Kwon Y K, Joh S J, et al. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 reveals a novel lineage close to the genus parechovirus in the family Picornaviridae[J]. The Journal of General Virology, 2006, 87(Pt 11): 3307-3316.

- [5] Kim M C, Kwon Y K, Joh S J, et al. Recent Korean isolates of duck hepatitis virus reveal the presence of a new genotype and serotype when compared to duck hepatitis virus type 1 type strains[J]. Archives of Virology, 2007, 152(11): 2059-2072.
- [6] Ding C Y, Zhang D B. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1[J]. Virology, 2007, 361(1): 9-17.
- [7] 张艳芳, 罗 薇, 刘内生, 等. 鸭肝炎病毒的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(7): 171-175.
- [8] Tseng C H, Tsai H J. Molecular characterization of a new serotype of duck hepatitis virus[J]. Virus Research, 2007, 126(1/2): 19-31.
- [9] Jin X, Zhang W, Hu X, et al. Identification and molecular analysis of the highly pathogenic duck hepatitis virus type 1 in Hubei Province of China[J]. Research in Veterinary Science, 2008, 85(3): 595-598.
- [10] 施少华, 程龙飞, 傅光华, 等. 鸭肝炎病毒新血清型基因组序列分析[J]. 微生物学报, 2009, 49(3): 309-315.
- [11] Liu G, Wang F, Ni Z, et al. Genetic diversity of the VP1 gene of duck hepatitis virus type 1 (DHV-1) isolates from southeast China is related to isolate attenuation[J]. Virus Research, 2008, 137(1): 137-141.

目前所用的 INH 已经由摇瓶培养原核表达的重组 INH 全面代替成本较高的人工化学合成的 INH。但是在实际生产中,摇瓶培养效率太低,不能满足畜牧业生产中的巨大需求。为提高生产效率,笔者首次引入发酵工业中的高密度发酵 (high cell-density fermentation, HCDF) 工艺。高密度发酵是应用一定的培养技术和设备来提高菌体生物量和目标产物时空产率的发酵技术。通过优化发酵过程中的多个相关因素,可以提高菌体数量和单细菌内蛋白表达量,最终达到提高目标蛋白产量的目的^[14-15]。目前,大肠杆菌高密度发酵技术广泛应用于多种重组蛋白的发酵生产中^[16-21],并取得了较好效果。然而,当前对于重组猪 INH α 亚基的大肠杆菌高密度发酵研究较少,无可以直接借鉴的经验。本研究对发酵培养基类型、乳糖诱导浓度、诱导时间进行探索,旨在为大规模发酵生产提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株、试剂及主要仪器

表达猪 INH α 亚基的工程菌 BL21 (DE3)/pRSET-INH 菌株由江苏省农业科学院动物品种改良和繁育重点实验室构建并保存。胰蛋白胨、酵母粉购自英国 Oxoid 公司,氨苄青霉素购自美国 Sigma 公司,其余试剂均为国产分析纯产品。种子培养基为 LB,发酵培养基共 3 种,分别为 TB 培养基(胰蛋白胨 12 g/L,酵母粉 24 g/L, KH_2PO_4 2.31 g/L, K_2HPO_4 12.54 g/L,甘油 4 mL/L)、组合培养基[葡萄糖 2 g/L,胰蛋白胨 8 g/L,酵母粉 12 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, MgSO_4 0.4 g/L, NaCl 2 g/L, Na_2HPO_4 4 g/L,柠檬酸钠 0.5 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.18 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L, H_3BO_3 0.06 g/L, MnSO_4 0.12 g/L, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, $\text{ZnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g/L]、M9 培养基(葡萄糖 4 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, MgSO_4 0.4 g/L, NH_4Cl 1 g/L, CaCl_2 0.02 g/L, NaCl 0.5 g/L, Na_2HPO_4 12.8 g/L)。补料培养基含大豆蛋白胨 10 g/L,牛肉膏 15 g/L, MnSO_4 25 mg/L, MgSO_4 5 g/L, NH_4Cl 15 g/L。种子培养基在使用前加入氨苄青霉素至终浓度为 60 g/L。水平恒温摇床(德国 Thermo 公司);20 L 全自动发酵罐系统(镇江东方生物工程设备技术有限责任公司);蛋白质垂直电泳系统(北京六一生物科技有限公司);分光光度计(德国 Eppendorf 公司)。

1.2 方法

1.2.1 菌种活化及扩大培养 将冻存于 -80°C 的表达菌株划线接种于 LB 固体培养基平板上, 37°C 培养 1 d,挑取单菌落接种于 5 mL LB 培养基中, 37°C 230 r/min 振荡培养 8 h 后,按 1:100 的比例接种于 LB 液体培养基中,继续振荡培养 10 h 作为发酵种子液。

1.2.2 发酵基本条件 发酵罐在使用前按照标准流程(过滤器消毒-部分管路消毒-空罐消毒)进行消毒灭菌处理。向灭菌后的发酵罐加入发酵罐总体积 4/5 的培养基(即 15 L 左右,但考虑到实消时会有 23 L 蒸馏水进入培养基造成培养基稀释,所以在配制时取 15 L 的培养基,加入 12 L 水,使发酵培养基初始浓度略高),并进行实效。实效结束,将培养基温度降至 37°C 、罐压降至 0 MPa,打开加料口,在火焰下灌入无菌氨苄青霉素至终浓度为 600 mg/L,同时按 5% 接种量接种

于发酵培养基中,并添加 2% 的有机硅消泡剂。关闭加料口开始发酵。发酵时,温度设定为 37°C ,搅拌速度设定为 200 r/min,罐压为 0.05 MPa,通风控制在 11.7 L/min。通过加氨水和稀盐酸调节发酵培养基的 pH 值,加入的氨水可以作为氮源供细菌利用。

1.2.3 不同培养基对宿主菌生长影响的研究 接种结束并开始发酵时,采集样品,此后 1 h 采样 1 次,用分光光度计测定细菌在 600 nm 处的吸光度,连续测定 3 次。同时监测菌液 pH 值,防止 pH 值偏离太大影响细菌生长。发酵结束后,离心收集菌体,尽量吸净残留培养基后称总细菌湿质量。最终根据细菌生长曲线、发酵终止时的总细菌湿质量以及培养基成本综合比较,选择出最适培养基。

1.2.4 不同乳糖浓度诱导对宿主菌生长及蛋白表达影响的研究 用上述筛选出的培养基作为后续试验的发酵培养基。按标准消毒流程消毒后接种并开始发酵。6 h 后,通过补料泵流加补料培养基,并持续发酵 20 h 后,用终浓度为 0、1、5、10、20 g/L 的乳糖分别进行诱导,1 h 采集 1 次样品,用分光光度计测定细菌 $D_{600\text{nm}}$,连续测定 3 次。同时监测菌液 pH 值,防止 pH 值偏离太大影响细菌生长。持续诱导 10 h 后发酵结束,离心收集菌体,尽量吸净残留培养基后称总细菌湿质量。对样品进行 SDS-PAGE 分析,观察蛋白条带表达规律,根据各诱导组的细菌重、蛋白表达规律综合分析何种浓度乳糖诱导可以促进细菌生长及蛋白表达,并明确诱导时间对蛋白表达的影响。

2 结果与分析

2.1 发酵培养基的优化

分别对 3 种发酵培养基进行发酵试验。接种后的前 10 h 发酵中,细菌在 3 种培养基中都表现出快速生长趋势,但是相对于 TB 培养基、组合(ZH)培养基,细菌在 M9 培养基中生长相对缓慢,并且 M9 培养基处理在发酵 10 h 后,细菌数量不再增加,处于平台期。虽然前 10 h 中,细菌在 TB 培养基、组合培养基中的增长较迅速,并且组合培养基比 TB 培养基更具优越性;但是 10 h 后,TB 培养基的后发优势明显,细菌增殖加速,直至第 20 h 达到最高值, $D_{600\text{nm}}$ 为 22.84 g/L。20 h 后细菌增长缓慢,菌体数量减少(图 1)。发酵结束后,对总细菌湿质量进行测量发现,TB 培养基菌体湿质量为 25.48 g/L(图 2)。由此可见,TB 培养基较适合重组抑制素工程菌的生长。从成本上来说,相对于 TB 培养基,虽然组合培养基中胰蛋白胨和酵母粉的含量为 TB 培养基的一半,但是添加了大量无机盐和微量元素,因此成本较 TB 培养基高。综合以上因素考虑,TB 培养基无论从生产效率上还是生产成本上都优于组合培养基、M9 培养基。因此,在后续的发酵试验和选择中,选择 TB 培养基作为发酵培养基。

2.2 乳糖诱导浓度和诱导时间的优化

接种发酵 20 h 后,分别用不同浓度乳糖进行诱导。添加乳糖后,细菌仍表现出增殖趋势,并且增殖速度快于对照,在乳糖浓度为 10 g/L 的条件下,表现出相对较快的增长趋势(图 3),发酵结束后对总细菌湿质量称量发现,在 10 g/L 乳糖诱导条件下,总细菌湿质量最大(图 4)。在乳糖的刺激下,表达载体在菌体内被快速激活并大量表达重组猪 INH 蛋白。

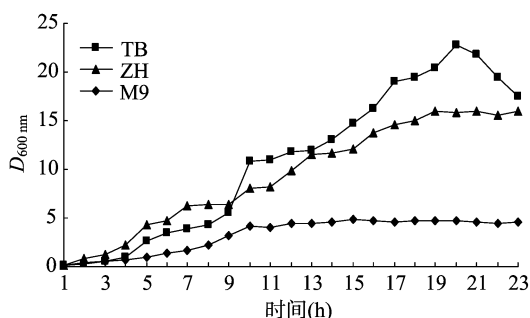


图1 细菌在不同发酵培养基中的生长曲线

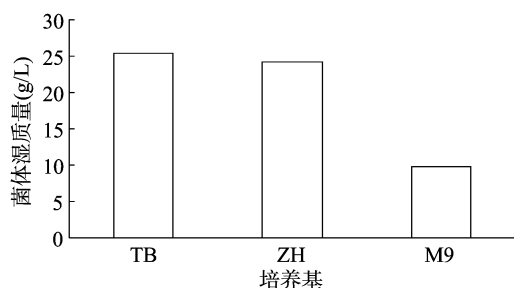


图2 发酵结束时不同发酵培养基中菌体湿质量

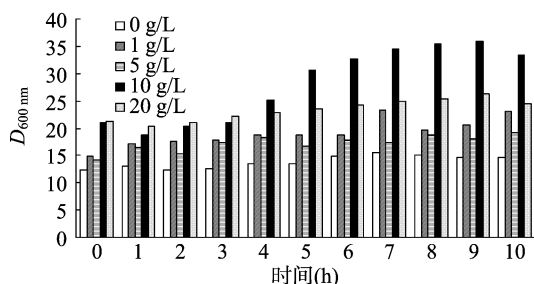


图3 细菌在不同浓度乳糖诱导中的生长趋势

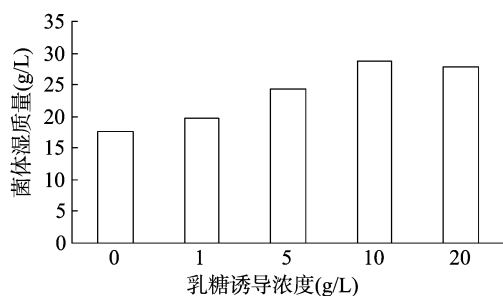


图4 发酵结束时不同乳糖诱导浓度的菌体湿重

不同乳糖浓度和诱导时间下,对重组蛋白的表达具有显著影响;无乳糖诱导时无蛋白表达(图5)。添加10 g/L乳糖进行诱导,对蛋白的表达具有最佳的诱导作用。然而在诱导时间对蛋白表达的影响方面,不同乳糖浓度处理又表现出相似性,最佳诱导时间均在5 h左右,超过5 h蛋白表达量不再增加,诱导时间过长反而将营养全部耗尽,导致菌体死亡使蛋白表达量或重组蛋白占菌体总蛋白的比例下降。添加乳糖诱导至发酵结束,发现 $D_{600\text{ nm}}$ 值比不添加乳糖组升高13,可能是因为添加大量乳糖后,乳糖可以作为细菌生长和蛋白表达所需的碳源,从而提高细菌的生长速度。

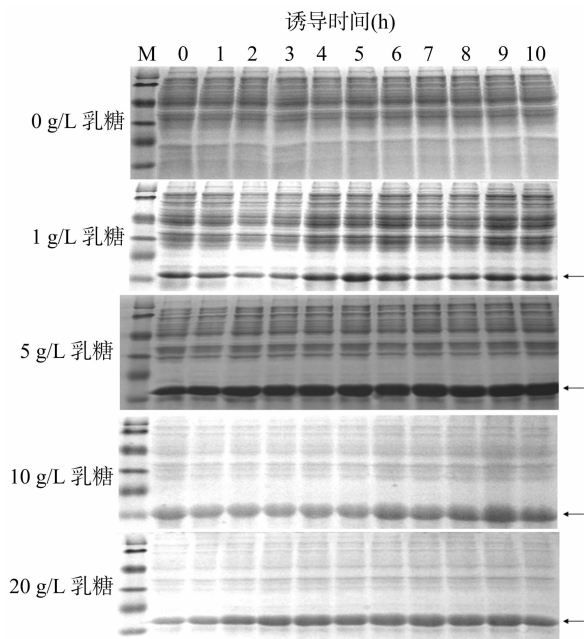


图5 重组 INH 在不同浓度乳糖诱导的表达

3 结论与讨论

大量试验证明,重组抑制素免疫在提高家畜繁殖力方面具有显著效果。因此,重组抑制素将在家畜繁殖生产领域具有巨大的市场潜力。为满足潜在的市场需求,本研究首次尝试利用发酵罐高密度发酵工艺对该蛋白进行大量制备,对发酵罐发酵的培养基、乳糖诱导浓度、诱导时间对细菌和蛋白表达的影响进行了探索。结果显示,TB培养基最适合用于本蛋白工程菌的高密度发酵,终浓度为10 g/L的乳糖对蛋白表达量有积极影响,诱导5 h时蛋白表达量达到最大值,经测定,重组蛋白占菌体总蛋白的50%以上。发酵过程中细菌 $D_{600\text{ nm}}$ 最高为22.84,细菌总湿质量为25.48 g/L。

在发酵工业中,一般认为细菌密度接近理论值的发酵为高密度发酵。通过高密度发酵,不但可以减少培养体积,强化下游分离提取,还可以缩短生产周期,减少设备投资,从而降低生产成本,提高产品在市场中的竞争力。但是由于细菌的菌株、菌种以及目标产物差异较大,高密度发酵的最终菌体生物量无法用一个确切的值或范围界定。Riesenberg 经计算认为,理论上大肠杆菌发酵所能达到的最高菌体密度为400 g/L^[22]。考虑到实际情况及各种条件限制,Märkl 等认为最高菌体密度为200 g/L^[23]。目前已有报道的最高大肠杆菌高密度发酵可达到190 g/L^[24],非常接近大肠杆菌在液体培养基中可能达到的理论最高水平。为获得较高的发酵密度,甚至将一些参数调整至极端,例如为提高溶氧量,对发酵罐注入高压纯氧^[25]或在培养基中添加 H_2O_2 , H_2O_2 则在细菌过氧化物酶的催化下,产生氧气从而提高发酵液的溶氧。但是,发酵系统中溶氧值过高又增加发酵成本,甚至还形成过氧化物、羟自由基等有害物质,反而抑制细菌的生长。相对于上述研究结果,本研究中虽然单细菌内重组 INH 蛋白的表达量最高可占到菌体总蛋白量的80%,但是由于技术、设备、经验等因素的限制,本研究中大肠杆菌发酵密度仅为25 g/L,与最高发酵密度

仍有较大差距。因此在以后的研究中,综合考虑可能的影响因素,将在接种量、接种时间、pH 值、溶氧量、通风量、诱导温度、补料培养基成分、补料时间、补料方式等方面进行综合研究,在不提高发酵成本的前提下,争取获得最大的细菌发酵密度和重组蛋白表达量。

目前实验室条件下摇瓶发酵重组蛋白普遍使用 IPTG 进行诱导。IPTG 在操作过程中对人体具有潜在的毒性,并且在蛋白质纯化过程中不容易去除干净,因此所制备的重组蛋白对动物应用时也存在安全隐患。另外,将有毒性的 IPTG 作为诱导剂,在有诱导细菌表达外源蛋白的同时会抑制细菌生长。另外,在发酵罐上进行大规模发酵生产中,对诱导剂的需求量较大,如果使用价格较昂贵的 IPTG 诱导,势必大幅提高生产成本,降低产品的竞争性。乳糖可以作为诱导剂诱导以 lac 操纵子及其衍生启动子控制下的诱导表达系统的表达,而且乳糖可以作为碳源被细菌利用,加之其成本较低、无毒的特点,因此目前多使用乳糖作为诱导剂^[26-27]。

参考文献:

- [1] de Jong F H. Inhibin[J]. *physiol Rev*, 1988, 68(2): 555 - 607.
- [2] Ying S Y. Inhibins and activins: chemical properties and biological activity[J]. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1987, 186(3): 253 - 264.
- [3] Burger H G, Igarashi M, Baird D T, et al. Inhibin: definition and nomenclature, including related substances[J]. *Clinical Endocrinology*, 1988, 28(4): 448 - 449.
- [4] Ying S Y. Inhibins, activins, and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of follicle - stimulating hormone[J]. *Endocrine Reviews*, 1988, 9(2): 267 - 293.
- [5] Knight P G, Clister C. Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary[J]. *Reproduction*, 2001, 121(4): 503 - 512.
- [6] Liu Y P, Mao X B, Wei Y M, et al. Studies on enhancing embryo quantity and quality by immunization against inhibin in repeatedly superovulated Holstein heifers and the associated endocrine mechanisms[J]. *Animal Reproduction Science*, 2013, 142(1/2): 10 - 18.
- [7] 覃广胜, 李德如, 韦英明, 等. 用免疫抑制素提高水牛超排效果的初步研究[J]. *畜牧与兽医*, 2012, 44(6): 35 - 37.
- [8] Brown R W, Hungerford J W, Greenwood P E, et al. Immunization against recombinant bovine inhibin alpha subunit causes increased ovulation rates in gilts[J]. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1990, 90(1): 199 - 205.
- [9] Li C, Zhu Y L, Xue J H, et al. Immunization against inhibin enhances both embryo quantity and quality in Holstein heifers after superovulation and insemination with sex - sorted semen[J]. *Theriogenology*, 2009, 71(6): 1011 - 1017.
- [10] Medan M S, Watanabe G, Sasaki K, et al. Effects of passive immunization of goats against inhibin on follicular development, hormone profile and ovulation rate[J]. *Reproduction*, 2003, 125(5): 751 - 757.
- [11] 于迎春, 施振旦, 刘颖, 等. 免疫抑制素提高粤黄鸡产蛋性能的研究[J]. *农业生物技术学报*, 2006, 14(1): 27 - 32.
- [12] 施振旦, 李明, 刘丽, 等. 免疫抑制素和卵泡抑素阻止夏季热应激导致的猪精液品质下降的研究[J]. *中国农业科学*, 2011, 44(7): 1488 - 1494.
- [13] Voge J L, Parker J B, Wheaton J E. Effects of immunization against alpha - inhibin using two adjuvants on daily sperm production and hormone concentrations in ram lambs[J]. *Domestic Animal Endocrinology*, 2009, 37(4): 206 - 213.
- [14] 李民, 陈常庆. 重组大肠杆菌高密度发酵研究进展[J]. *生物工程进展*, 2000, 20(2): 26 - 31.
- [15] 柴家前, 陆庆泉, 沈志强, 等. 大肠杆菌高密度发酵研究进展[J]. *中国预防兽医学报*, 2000, 22(6): 72 - 74.
- [16] Seo M J, Choi H J, Chung K H, et al. Production of a platelet aggregation inhibitor, salmosin, by high cell density fermentation of recombinant *Escherichia coli*[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2011, 21(10): 1053 - 1056.
- [17] Premasukh A, Lavoie J M, Cizeau J, et al. Development of a GMP phase III purification process for VB4 - 845, an immunotoxin expressed in *E. coli* using high cell density fermentation[J]. *Protein Expression and Purification*, 2011, 78(1): 27 - 37.
- [18] Fong B A, Wood D W. Expression and purification of ELP - intein - tagged target proteins in high cell density *E. coli* fermentation[J]. *Microbial Cell Factories*, 2010, 9: 77.
- [19] Yazdani S S, Shakri A R, Chitnis C E. A high cell density fermentation strategy to produce recombinant malarial antigen in *E. coli*[J]. *Biotechnology Letters*, 2004, 26(24): 1891 - 1895.
- [20] Khalilzadeh R, Shojaosadati S A, Bahrami A, et al. Over - expression of recombinant human interferon - gamma in high cell density fermentation of *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology Letters*, 2003, 25(23): 1989 - 1992.
- [21] Riesenber D, Menzel K, Schulz V, et al. High cell density fermentation of recombinant *Escherichia coli* expressing human interferon alpha 1[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1990, 34(1): 77 - 82.
- [22] Riesenber D. High - cell - density cultivation of *Escherichia coli*[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 1991, 2(3): 380 - 384.
- [23] Märkl H, Zenneck C, Dubach A C, et al. Cultivation of *Escherichia coli* to high cell densities in a dialysis reactor[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1993, 39(1): 48 - 52.
- [24] Fuchs C, Köster D, Wiebusch S, et al. Scale - up of dialysis fermentation for high cell density cultivation of *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2002, 93(3): 243 - 251.
- [25] 张虎成, 张征田, 杨国伟, 等. 重组蛋白 G 基因工程菌高密度发酵及其分离纯化[J]. *基因组学与应用生物学*, 2013, 32(3): 347 - 352.
- [26] Gombert A K, Kilikian B V. Recombinant gene expression in *Escherichia coli* cultivation using lactose as inducer[J]. *Journal of Biotechnology*, 1998, 60(1/2): 47 - 54.
- [27] Neubauer P, Hofmann K. Efficient use of lactose for the lac promoter - controlled overexpression of the main antigenic protein of the foot and mouth disease virus in *Escherichia coli* under fed - batch fermentation conditions[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 1994, 14(1): 99 - 102.