

响应面优化重组大肠杆菌表达 RGD-TRAIL 发酵工艺

曹家明¹, 韦利军^{*1}, 刘福松²

(1. 常州千红生化制药股份有限公司, 江苏 常州 213022; 2. 中国药科大学 生命科学与技术学院, 江苏 南京 210009)

摘要: 为了提高 RGD-TRAIL 的表达量, 对重组大肠杆菌的发酵工艺进行优化。在单因素实验的基础上, 采用 Box-Behnken 实验设计进行了四因素三水平的响应面分析试验, 研究了接种体积分数、pH 值、诱导时间、诱导温度对 RGD-TRAIL 表达的影响。响应面结果表明, RGD-TRAIL 表达的最佳条件为: 接种体积分数 7.88%, pH 值 7.02, 诱导时间 10.25 h, 诱导温度 22 ℃。在此条件下 RGD-TRAIL 的表达量达到 17.27%, 与模型预测表达量(17.31%)接近, 较优化前提高了 40.06%。

关键字: 重组大肠杆菌; RGD-TRAIL; 发酵工艺; 响应面优化

中图分类号: Q 937.9 文献标志码: A 文章编号: 1673-1689(2018)03-0283-06

Optimization of Fermentation Conditions for RGD-TRAIL Production by Recombinant *E.coli* Using Response Surface Method

CAO Jiaming¹, WEI Lijun^{*1}, LIU Fusong²

(1. Changzhou Qianhong Bio-Pharma Co., Ltd. Changzhou 213022, China; 2. School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: In order to enhance the production of RGD-TRAIL by recombinant *E.coli*, response surface methodology was applied to optimize the fermentation conditions. Based on the single factor experiments, the inoculation volume, pH value, the induction temperature and induction time were optimized by response surface optimization with 4 factors 3 levels using Box-Behnken experimental design. The optimum conditions for production of RGD-TRAIL were determined as follows: inoculation volume of 7.88%, pH 7.02, the induction time of 10.25 h, induction temperature of 22 ℃. Under the optimal fermentation conditions, the expression of RGD-TRAIL was 17.27%, which was close to the model prediction expression and 40.06% higher than that before optimization.

Keywords: recombinant *E.coli*, RGD-TRAIL, fermentation conditions, response surface optimization

收稿日期: 2015-10-08

基金项目: 国家科技重大专项项目(2009ZX09103-675); 国家科技重大专项(重大新药创制)项目(2012ZX09401012); 常州科技支撑计划(社会发展)项目(CE20115044)。

作者简介: 曹家明(1985—), 男, 江苏常州人, 工学硕士, 工程师, 主要从事生物药物开发、基因工程菌发酵、蛋白药物纯化等方面研究。E-mail: cao534@163.com

* 通信作者: 韦利军(1972—), 男, 内蒙古包头人, 理学博士, 高级工程师, 主要从事微生物与生化药学方面的研究。
E-mail: wljcpu@163.com

引用本文: 曹家明, 韦利军, 刘福松. 响应面优化重组大肠杆菌表达 RGD-TRAIL 发酵工艺[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(03): 283-288.

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (TNF related apoptosis-induced ligand, TRAIL) 是 Wiley 等^[1]于 1995 年发现并克隆的 TNF 家族成员, 其广泛表达于胸腺、肝脏、胎盘、外周血淋巴细胞等多种组织中^[2]。TRAIL 可选择性地诱导乳腺癌、肝癌、肺癌、宫颈癌、结肠癌、淋巴瘤以及中枢神经系统肿瘤等肿瘤细胞凋亡, 而对正常组织和细胞没有明显毒性效应^[3-4]。体内实验表明, TRAIL 能引起移植入鼠和猴体内的肿瘤消失或显著地抑制肿瘤生长^[5-6]。目前, TRAIL 已成为特异性杀伤肿瘤细胞的研究热点, 有望成为潜在的抗肿瘤药物。

整合素是一类细胞粘附受体家族蛋白, 在骨肉瘤、肺癌、乳腺癌等多种肿瘤细胞表面有高水平的表达^[7]。研究表明, 该蛋白质与肿瘤细胞生长、分化、转移、凋亡密切相关^[8], 而 RGD 肽(精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸)能够与整合素专一性结合, 活化凋亡前体蛋白, 从而介导肿瘤血管内皮细胞凋亡^[8-9]。Arap 等^[10]将 RGD 同阿霉素结合, 发现新的化合物对移植裸鼠体内的人乳腺癌细胞作用增强, 毒性降低。因此, 将诱导肿瘤细胞凋亡的 TRAIL 和对肿瘤细胞具有靶向性的 RGD 结合, 可以将治疗效应的分子靶向肿瘤部位, 将会具有更好的抗肿瘤活性和更低的毒副作用^[8]。

响应面法优化能以较少的实验次数对多个实验因素及其相互影响进行考察和评价, 从而快速有效地确定最优条件^[11]。目前响应面法已广泛用于培养基、酶催化和发酵过程的优化^[12-14]。作者采用响应面分析法对影响 RGD-TRAIL 发酵的 4 个主要因素: 接种体积分数、pH 值、诱导温度和诱导时间进行了优化, 旨在提高 RGD-TRAIL 表达量, 为放大生产提供理论依据和参考。

1 材料与方法

1.1 菌株

重组大肠杆菌 RT, 宿主菌 *E. coli* BL21(DE3), 载体 pET28a, 卡那霉素抗性: 作者所在公司保存。

1.2 培养基

1.2.1 种子培养基 (g/L) 蛋白胨 10; 酵母粉 5; NaCl 10。

1.2.2 发酵培养基 (g/L) 蛋白胨 12; 酵母粉 24; 三水磷酸氢二钾 16.4; 磷酸二氢钾 2.31; 甘油 5; 体积分数 0.1% 的 1 000×卡那霉素。

1.3 仪器与设备

BSC-1600IIA2 型生物安全柜: 苏州安泰空气技术有限公司; ZQPZ-228 型组合式振荡培养箱: 天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司; MINI-PROTEAN Tetra Cell 型电泳仪, Universal hoA560 II 型凝胶成像系统: 美国 Bio-Rad 公司。

1.4 培养方法

1.4.1 种子培养 从抗性平板挑取重组大肠杆菌单克隆接入盛有 5 mL LB 培养基的试管中, 37 °C、200 r/min 培养 12 h 后得一级种子液。按 0.1% 的接种体积分数将一级种子液接入盛有含 30 mL LB 培养基的 150 mL 三角瓶中, 37 °C、200 r/min 培养 12 h 后得二级种子液。

1.4.2 菌种发酵 将二级种子液按一定的接种体积分数分别接入不同 pH 值的 150 mL 发酵培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 6 h 后降温到 25 °C, 添加终浓度为 0.8 mmol/L 的 IPTG 进行诱导, 诱导一定时间后结束发酵。

1.4.3 RGD-TRAIL 表达量检测 取相当于 OD₆₀₀=1 的菌液 1 mL, 冰浴中超声破碎, 破碎液 10 000 r/min 离心 3 min, 所得上清液和 4×SDS 上样缓冲液按体积比 3:1 混合后煮沸 5 min, 然后进行 SDS-PAGE (15 g/dL 的分离胶, 上样 10 μL), 分离胶采用凝胶成像系统进行扫描, Qscan Demo 软件计算 RGD-TRAIL 表达量。实验过程中采用破壁离心上清液进行电泳检测, 离心过程已经去除包涵体, 因此, 电泳检测结果均为可溶性 RGD-TRAIL。

1.5 试验方法设计

1.5.1 单因素试验 利用重组大肠杆菌发酵生产 RGD-TRAIL, 对其发酵工艺中的接种体积分数 (3%、6%、9%、12%、15%), 发酵液初始 pH 值 (6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5) 和诱导时间 (4、8、12、16、20 h) 进行单因素考察, 每个实验重复 3 次。

1.5.2 响应面优化 通过单因素得到的结果, 采用 Box-Behnken 实验设计对其发酵工艺进行响应面优化, 实验重复 3 次。

1.5.3 数据分析方法 利用 Origin 8.0 进行数据处理, Design Expert 8.0.5 进行响应面分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 接种体积分数对 RGD-TRAIL 表达的影响

接种体积分数大小直接影响发酵周期,接种体积分数较大时种子液中较多的胞外水解酶有利于营养物质的利用,从而缩短发酵周期,提高 RGD-TRAIL 表达量,同时减少了杂菌生长的机会;接种体积分数过大时菌种生长过快,导致发酵液粘度增加,溶氧降低,菌体过早进入衰亡期,蛋白质表达量下降^[15]。按 1.4.2 的实验方法,分别按 3%、6%、9%、12%、15% 的接种体积分数将种子液接种于 pH 7.5 的发酵培养基中,诱导 16 h 结束发酵,考察不同接种体积分数对 RGD-TRAIL 表达的影响,结果见图 1。从图 1 可以看出,随着接种体积分数的增大,RGD-TRAIL 表达量逐渐增加,当接种体积分数为 9% 时,RGD-TRAIL 表达量最高,继续增加接种体积分数,RGD-TRAIL 表达量出现缓慢下降。因此,选择 9% 的接种体积分数最有利于 RGD-TRAIL 表达。

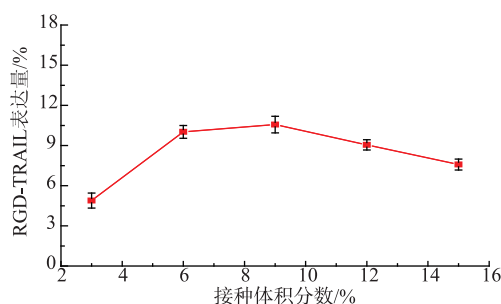


图 1 接种体积分数对 RGD-TRAIL 表达的影响

Fig. 1 Effects of inoculation volume on RGD-TRAIL expression

2.1.2 pH 值对 RGD-TRAIL 表达的影响 pH 值的变化会引起多种酶活性的改变,影响菌体对底物的吸收利用,从而影响菌体的生长和目的蛋白质的合成^[15]。按 1.4.2 试验方法,接种体积分数采用 9%,将种子液接种于 pH 值分别为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 的发酵培养基中,诱导 16 h 结束发酵,考察不同 pH 值对 RGD-TRAIL 表达的影响,结果见图 2。从图 2 可以看出,不同 pH 值的发酵培养基中均能表达 RGD-TRAIL,pH 值 7.0~7.5 时 RGD-TRAIL 表达量较高,而 pH 值为 7.0 时 RGD-TRAIL 表达量最高,达到 11.86%,因此,选择 pH 7.0 作为发酵培养基的最佳 pH 值。

2.1.3 诱导时间对 RGD-TRAIL 表达的影响 诱导时间的长短影响目的蛋白的表达量,从而对发酵产生重要影响。按 1.4.2 的实验方法,接种体积分数采用 9%,发酵培养基 pH 值调节为 7.0,诱导 20 h 结

束发酵,分别于诱导 4、8、12、16、20 h 时取样,考察诱导时间对 RGD-TRAIL 表达的影响,结果见图 3。从图 3 可以看出,随着诱导时间的增加,RGD-TRAIL 表达量迅速增加,诱导 12 h 时,RGD-TRAIL 表达量达到最大值(12.33%);随后 RGD-TRAIL 表达量开始缓慢下降。因此,诱导时间选择 12 h 最佳。

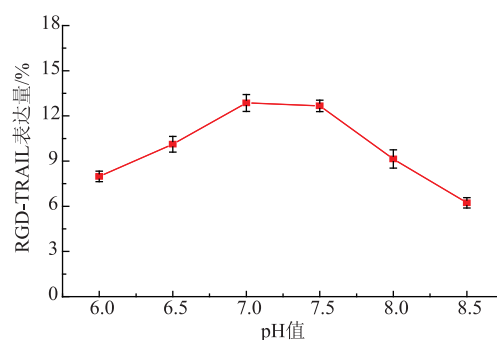


图 2 pH 值对 RGD-TRAIL 发酵工艺的影响

Fig. 2 Effects of pH on RGD-TRAIL expression

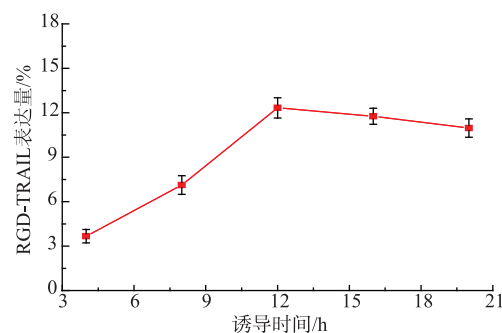


图 3 诱导时间对 RGD-TRAIL 发酵工艺的影响

Fig. 3 Effects of induction time on RGD-TRAIL expression

2.2 可溶性 RGD-TRAIL 发酵中心组合试验设计及响应优化分析

2.2.1 因素与水平的确定 通过诱导温度和诱导剂浓度对 RGD-TRAIL 表达量的影响研究^[16],发现诱导温度对 RGD-TRAIL 表达影响较大,25 ℃诱导时可 RGD-TRAIL 表达量最高。结合 2.1 中单因素试验结果,采用 Box-Behnken 中心组合试验设计,以诱导温度 25 ℃、接种体积分数 9%、pH 7.0,诱导时间 12 h 为中心点,以 RGD-TRAIL 表达量为响应值,进行四因素三水平实验设计,实验方案见表 1。

2.2.2 Box-Behnken 实验结果 实验共 27 组实验,实验号 1~24 为析因试验,实验号 25~27 为中心点试验,实验结果见表 2。

表 1 各因素水平与取值

Table 1 Factors and levels of variances

因素	名称	水平		
		-1	0	+1
A	接种体积分数/%	7	9	11
B	pH 值	6.6	7.0	7.4
C	诱导时间/h	10	12	14
D	诱导温度/℃	22	25	28

表 2 Box-Behnken 试验设计方案及结果

Table 2 Design and values of Box-Behnken experiments

实验编号	A	B	C	D	RGD-TRAIL 表达量/%
1	-1	-1	0	0	12.42±0.72
2	1	-1	0	0	10.75±0.55
3	-1	1	0	0	9.89±0.43
4	1	1	0	0	9.62±0.54
5	0	0	-1	-1	16.85±0.88
6	0	0	1	-1	12.60±0.62
7	0	0	-1	1	11.34±0.57
8	0	0	1	1	12.83±0.36
9	-1	0	0	-1	13.52±0.87
10	1	0	0	-1	12.04±0.31
11	-1	0	0	1	10.11±0.77
12	1	0	0	1	11.44±0.64
13	0	-1	-1	0	15.14±0.82
14	0	1	-1	0	12.67±0.67
15	0	-1	1	0	12.88±0.49
16	0	1	1	0	11.21±0.81
17	-1	0	-1	0	13.16±0.58
18	1	0	-1	0	11.72±0.46
19	-1	0	1	0	10.16±0.35
20	1	0	1	0	10.98±0.47
21	0	-1	0	-1	15.86±0.66
22	0	1	0	-1	13.64±0.73
23	0	-1	0	1	12.31±0.29
24	0	1	0	1	10.68±0.75
25	0	0	0	0	14.52±0.65
26	0	0	0	0	15.77±0.34
27	0	0	0	0	15.35±0.52

2.2.3 模型的建立及方差分析 应用 Design Expert 软件对响应值和各因素进行回归拟合,得到重组大肠杆菌发酵表达 RGD-TRAIL 的二次回归方程:

$$Y = -1569.30 + 24.60A + 467.24B - 6.63C - 2.98D + 1.75AB + 0.28AC + 0.23AD + 0.50BC + 0.25BD + 0.24CD - 2.87A^2 - 36.64B^2 - 0.23C^2 - 0.08D^2$$

以 RGD-TRAIL 表达量为响应值,根据表 2 实验结果,应用 Design Expert 软件对模型进行回归分析,结果见表 3。

表 3 实验结果回归分析

Table 3 Regression analysis of experiment results

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	100.25	14	7.16	31.51	<0.000 1
A	0.61	1	0.61	2.69	0.126 7
B	11.31	1	11.31	49.77	< 0.000 1
C	8.70	1	8.70	38.30	< 0.000 1
D	20.80	1	20.80	91.54	< 0.000 1
AB	0.49	1	0.49	2.16	0.167 7
AC	1.28	1	1.28	5.62	0.035 4
AD	1.97	1	1.97	8.69	0.012 2
BC	0.16	1	0.16	0.70	0.417 8
BD	0.087	1	0.087	0.38	0.547 6
CD	8.24	1	8.24	36.24	< 0.000 1
A ²	44.02	1	44.02	193.69	< 0.000 1
B ²	11.45	1	11.45	50.39	< 0.000 1
C ²	4.38	1	4.38	19.29	0.000 9
D ²	2.59	1	2.59	11.39	0.005 5
残差	2.73	12	0.23		
失拟项	1.92	10	0.19	0.47	0.828 0
纯误差	0.81	2	0.40		
总和	102.98	26			

从表 3 可以看出,回归模型 $P < 0.000 1$,失拟项 $P > 0.05$ 值不显著,说明构建的模型和真实值之间能够较好地拟合。该模型决定系数 $R^2 = 0.973 5$,表明该模型可以解释响应面中 97.35% 的可变性。模型中自变量 B、C、D、CD、A²、B² 的 P 值达到了极显著的水平,说明 pH、诱导温度、诱导时间及诱导温度和诱导时间的交互作用对 RGD-TRAIL 发酵工艺的影响最为显著,且各影响因素和影响值之间不是线性关系。

2.2.4 响应面及等高线分析结果 对构建的回归模型进行响应面分析,考察了各因素间交互作用与响应值之间的响应曲面图,结果见图 4。从图 4 可以看出:因素 C 与因素 D 的交互作用曲面最为陡峭,且等高线呈椭圆,表明诱导温度和诱导时间交互作用对 RGD-TRAIL 发酵工艺影响比较显著,这与表 3 中回归分析结果是一致的。

对回归方程进行偏导求解,得出重组大肠杆菌表达 RGD-TRAIL 最佳发酵条件为:接种体积分数 7.88%,pH 值 7.02,诱导时间 10.25 h,诱导温度

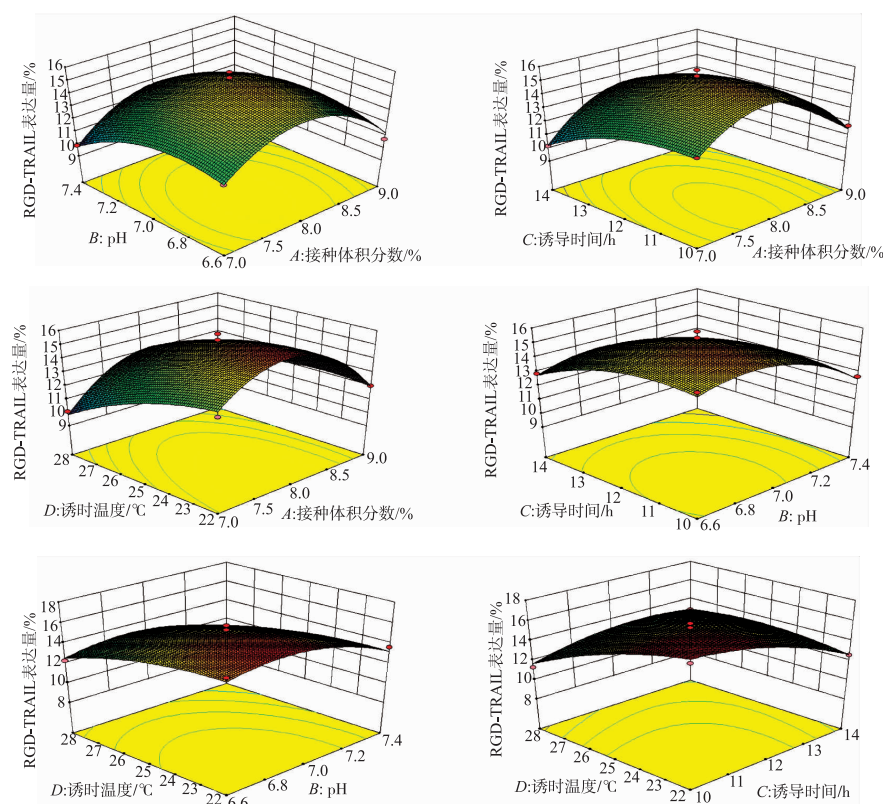


图 4 各因素交互效应对 RGD-TRAIL 表达量的响应面图

Fig. 4 Response surface curve of RGD-TRAIL affected by two-factor interactions

22℃,此时RGD-TRAIL 表达量的预测值达到最大,为 17.31%。

2.2.5 验证实验 为检验试验的可靠性,采用上述最优发酵条件进行了 3 次 RGD-TRAIL 发酵验证试验,得到 RGD-TRAIL 的表达量为 $17.27 \pm 0.76\%$,与模型预测值接近,证明该模型描述 RGD-TRAIL 发酵工艺是可行的。

3 结 语

目前,肿瘤已经成为严重威胁人类健康的常见疾病。2014 年世界卫生组织癌症报告称,2012 年全球新增癌症病例 1 400 万,预计到 2035 年全球将新增 2 200 万的癌症病例。艾美仕(IMS)公司预测,2018 年全球抗肿瘤药物市场规模将达到 1 000 亿美元。蛋白类抗肿瘤药物由于具有高效低毒,避免放化疗的副作用而成为了各大制药公司近年来的研发热点。

TRAIL 特异性的诱导肿瘤细胞凋亡而对正常细胞无毒性的独特优势,使其成为抗肿瘤药物中潜在的“重磅炸弹”。目前基因泰克正在进行 II 期临床

试验,上海恰尔生物技术有限公司已经获批进行 III 期临床试验,上海歌佰德生物技术有限公司已经完成 III 期临床研究,人福药业也已获批进行 II、III 期临床试验,然后由于缺乏肿瘤选择性,大剂量的 TRAIL 可引起肝毒性、过敏性毒性等副作用。为了降低 TRAIL 的毒副作用,我公司同南京大学合作,针对肿瘤新手微血管上的 $\alpha_3\beta_1/\alpha_5\beta_1$ 整合素开发了具有靶向性的一类抗肿瘤新药 RGD-TRAIL。由于 RGD 肽的靶向作用,更多的重组蛋白和死亡受体结合,激活凋亡通路,使 RGD-TRAIL 具有更强的抗肿瘤活性和更低的毒副作用。体外实验表明 RGD-TRAIL 对 COLO205(结肠癌)、A-673(骨癌)、NCI-H358(非小细胞肺癌)等肿瘤细胞最为敏感,其 IC₅₀ 值皆小于 0.05 $\mu\text{g/mL}$;体内动物实验表明,RGD-TRAIL 具有良好的抗肿瘤活性,等效剂量是 TRAIL 的五分之一。

大肠杆菌由于结构简单、遗传背景清晰、生长周期短而广泛用于重组蛋白的表达系统。外源基因在大肠杆菌中的表达不仅受载体、启动子和目的基因的影响,而且和重组菌的培养条件息息相关。

RGD-TRAIL 表达过程中由于出现蛋白质的非正确折叠而形成包涵体,因此,进行培养条件的优化来提高 RGD-TRAIL 表达量(可溶性)有着重要意义。而响应面分析法作为一种优化方法,可以在更广泛的范围考虑因素的组合,优化发酵条件,预测响应值,使工程菌在最佳的发酵条件中生长繁殖,进而获得较多的目的蛋白。

前期研究发现接种体积分数、pH 值、诱导温度、诱导时间等培养条件对 RGD-TRAIL 的积累均产生重要影响。响应面实验结果回归分析发现,pH 值、诱导温度、诱导时间的 *P* 值均达到极显著水平,这和预实验的结果是一致的。pH 值不仅可以影响工程菌对营养物质的吸收,而且影响多种酶的活性。诱导温度对目的蛋白的表达十分关键,诱导温度较高时目的蛋白来不及正确折叠而形成大量包涵体,给后续分离带来困难,而且会增加质粒的不

稳定性;诱导温度过低时抑制工程菌生长,导致 RGD-TRAIL 产量降低。诱导时间是影响目的蛋白产量的又一重要因素,诱导时间过短,RGD-TRAIL 合成量少;诱导时间过长,营养物质消耗殆尽,有害物质积累导致重组菌的负担过重,造成目的蛋白降解。回归分析同时发现,诱导温度和时间之间存在相互影响,借助响应面图可以看出等高线呈现椭圆形,表明这两个因素相互作用极其显著,等高线中最小椭圆的中心点即使响应面的最高点。通过对回归方程的求解,得到 RGD-TRAIL 最佳发酵工艺条件为:接种体积分数 7.88%,pH 值 7.02,诱导时间 10.25 h,诱导温度 22 °C。在此最佳发酵条件下 RGD-TRAIL 的理论表达量为 17.31%。在验证实验中 RGD-TRAIL 的表达量为 17.27%,较优化前提高了 40.06%。本研究为 RGD-TRAIL 的生产奠定了基础。

参考文献:

- [1] WILEY S R, SCHOOLEY K, SMOLAK P J, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family induces apoptosis[J]. **Immunity**, 1995, 3(6): 673-682.
- [2] WU D M, JIN L N, LIU S Y, et al. Prokaryotic expression and renaturation of recombinant human extracellular TRAIL fragment[J]. **Journal of Nanjing Normal University: Natural Science**, 2006, 29(2): 85-90.
- [3] ZHANG Yingli, LIN Chenshui. Design, synthesis and expression of TRAIL genes[J]. **Journal of Zhejiang University of Technology**, 2011, 39(1): 47-50. (in Chinese)
- [4] TU Longxia, WU Yaou, ZHANG Linjie. Experimental study on apoptosis of SGC-7901 cell induced by TRAIL combined with paclitaxel[J]. **Chinese Journal of Immunology**, 2012, 4(28): 308-311. (in Chinese)
- [5] WALCZAK H, MILLER R E, ARIAIL K, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo[J]. **Nat Med**, 1999, 5(2): 157-163.
- [6] 唐蓓. 人 TRAIL 分子胞外区的克隆、表达纯化及生物学活性鉴定[D]. 重庆: 重庆大学, 2003.
- [7] XIAO Bin, ZHU Yonghong, ZOU Quanming. The research on development of the role of RGD-peptides in tumor therapy[J]. **Chinese Journal of Clinical Oncology**, 2005, 32(19): 1135-1137. (in Chinese)
- [8] WANG Yu, YUAN Jianlei, YU Quan, et al. Study on the purity analysis method of recombinant human tumor necrosis factor (TNF) related apoptosis inducing ligand variant (R-TRAIL) by HPLC[J]. **Pharmaceutical Biotechnology**, 2014, 21(5): 437-440. (in Chinese)
- [9] ZHAO Lihong, FAN Qinlin, ZOU Wenyi, et al. Cloning, expression and purification of RGD-sTRAIL and its anti-tumor effects in vitro[J]. **Letters in Biotechnology**, 2004, 15(3): 226-230. (in Chinese)
- [10] ARAPRA W, PASQUALINI R, RUOSLAHTI E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model[J]. **Science**, 1998, 279(5349): 377-380.
- [11] GHORBEL B O, HAJJI S, YOUNES I, et al. Optimization of chitin extraction from shrimp waste with *Bacillus pumilus* A1 using response surface methodology[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2013, 61: 243-50.
- [12] ZHU Y P, LI X T, TENG C, et al. Enhanced production of α -glucosidase inhibitor by a newly isolated strain of *Bacillus subtilis* B2 using response surface methodology[J]. **Food and Bioprocess Technology**, 2013, 91(3): 264-270.
- [13] SINGH P, SHERA S S, BANIK J, et al. Optimization of cultural conditions using response surface methodology versus artificial neural network and modeling of L-Glutaminase production by *Bacillus cereus* MTCC 1305[J]. **Bioresour Technol**, 2013, 137: 261-269.
- [14] XIAO Y, ZHANG X, ZHU M, et al. Effect of the culture media optimization, pH and temperature on the biohydrogen production and the hydrogenase activities by *Klebsiella pneumoniae* ECU-15[J]. **Bioresour Technol**, 2013, 137: 9-17.