



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20160088

毕赤酵母热致死动力学模型的建立与检验

田康明¹, 段威², 王正祥¹, 路福平²

(1. 天津科技大学化工与材料学院, 天津 300457;

2. 工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 毕赤酵母作为最成熟的蛋白质过量表达平台微生物之一, 广泛应用于酶制剂、功能性大分子等大宗产品的发酵制造. 建立毕赤酵母常规温度下(50~60℃)的热致死动力学模型, 有助于指导毕赤酵母发酵制造体系的菌体后处理工艺, 增加菌体利用价值. 为了建立毕赤酵母在 50~60℃条件下热致死动力学模型, 将不同菌体量的毕赤酵母菌液在 50、55、60℃条件下进行不同时间热灭活处理, 通过平板培养活细胞计数的方法评价不同处理方式下毕赤酵母的热致死效果, 得到的致死曲线用 Weibull 模型和多元回归方程进行拟合构建热致死动力学模型, 并对建立的模型进行数学检验和实用性检验. 结果表明: 建立的毕赤酵母热致死动力学模型可靠, 具有实际使用价值. 本研究所建立的模型能较好地模拟不同温度、不同处理时间对不同菌体量的毕赤酵母热致死效果的影响. 并可以为毕赤酵母热灭活处理条件的确定提供计算依据.

关键词: 毕赤酵母; 致死动力学; 预测微生物学; Weibull 模型

中图分类号: Q939.97

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2017)02-0024-06

Construction and Verification of a Model for the Lethal Thermal Kinetics of *Pichia pastoris*

TIAN Kangming¹, DUAN Wei², WANG Zhengxiang¹, LU Fuping²

(1. College of Chemical Engineering and Materials Science, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;

2. Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: *Pichia pastoris*, as one of the most mature protein overexpression platforms in the study of microorganisms, was widely used for bulk product manufacturing such as enzyme and functional macromolecule. Establishing a lethal thermal kinetics model of *Pichia pastoris* under various heat treatment conditions from 50 °C to 60 °C will supply a guide to *Pichia pastoris* cell manufacturing system and increase the utilization value of cellmass. The lethal thermal kinetics of *Pichia pastoris* under various heat treatment conditions from 50 °C to 60 °C was investigated, and the availability and feasibility of the model was verified by live cell lethal tests. The cell culture of *Pichia pastoris* GS115 with different optical density was incubated at 50 °C, 55 °C and 60 °C for various heating time respectively, then the obtained lethal curves were fitted using the Weibull model and calculated using multiple regression equation to establish the lethal thermal kinetics model. Subsequently the feasibility and practical lethality were confirmed by live cell lethal tests. A *Pichia pastoris* lethal thermal kinetics model was thus established, and its availability and feasibility were confirmed. The established model in this study can be used to describe the lethal thermal kinetics of *Pichia pastoris* under various heat treatment conditions. The methods constructed here can be used for getting the suitable heat treatment process for heat inactivation of *Pichia pastoris*.

Key words: *Pichia pastoris*; death kinetics; predictive microbiology; Weibull model

毕赤酵母(*Pichia pastoris*)表达体系具有表达率高、遗传稳定、产物可分泌、发酵工艺成熟等许多优

收稿日期: 2016-03-14; 修回日期: 2016-05-27

作者简介: 田康明(1985—), 男, 山东济南人, 讲师; 通信作者: 王正祥, 教授, zx.wang@tust.edu.cn

点,这使得其成为应用最广泛的真核表达体系^[1]。从20世纪80年代初开始,人们已经用毕赤酵母表达体系成功表达疫苗、激素、抗菌肽、干扰素、工业酶、膜受体蛋白、细胞毒素及其衍生物等上千种蛋白,毕赤酵母生产体系在工业上已是仅次于大肠杆菌(*E. coli*)的最常用蛋白表达系统^[2-3],所涉及到的领域有水产业^[4]、饲料加工业^[5]以及动物传染病的防治^[6]等。以毕赤酵母表达生产工业酶为例,发酵生产过程完成后,需要对发酵液中的酶进行板框过滤除去菌体,陶瓷膜过滤除去细胞碎片和大分子蛋白等,并通过添加相应的辅助材料获得工业酶制剂产品。分离提取过程形成的菌体残渣通常通过烘干的方式制备成副产品用于饲料蛋白的添加。发酵结束后产品的分离提取过程及菌体残渣的烘干过程属于典型的开放式操作,很容易造成拥有自主知识产权的重组菌种流失。基因重组的毕赤酵母如果进入到环境中,可能污染人类赖以生存的自然环境,影响到人体健康和生态环境,还可能打破原有的生态平衡^[7]。因此,如何采用简单易行且安全可靠的方式在充分保证产品活力前提下彻底灭活提取液中的活细胞是工业酶生产中的关键环节,对于表达产物在胞内的菌液显得尤为重要。工业上对酵母发酵液灭活处理有酶法、超声波、机械研磨、高压匀浆等多种方法,但是热处理灭活却是最有效、最经济、最简单的方法。酵母对高温敏感^[8],可以在对发酵产品影响较小的情况达到全部灭活的目的。通过热处理也有利于酵母营养物质的提取^[9]和目标产物的分离。本文主要考察毕赤酵母在50~60℃的致死规律,并建立相关模型,为毕赤酵母生产体系中建立有效的菌种热灭活方法提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 菌种与培养基

毕赤酵母(*Pichia pastoris*)GS115购自Invitrogen公司,现保藏于本研究室。

YPD培养基(g/L):酵母提取物10,蛋白粉20,葡萄糖20。

1.2 样品处理

取培养24h的毕赤酵母菌液,放入灭菌的离心管中,8000 r/min离心5 min,弃上清液。再用YPD培养基将菌体重悬,配制成不同浓度的毕赤酵母菌液。

1.3 热处理

取10 mL不同浓度的毕赤酵母菌液,放入50 mL

离心管中。将离心管于30℃条件下维持5 min,然后分别放入50、55和60℃的水浴摇床,转速为100 r/min,放入后开始计时,处理一定时间。处理结束后将处理液放入冰水中。

1.4 微生物计数及致死效果的检测

根据GB/4789.15—2010方法,对热处理前后的菌液进行菌落计数^[10]。吸取1 mL加热处理前后的稀释菌液到灭菌的平皿中,再进行倾注,混匀后放置30℃培养,48 h后统计单菌落数。致死效果用致死率(*R*)和残存对数($\lg S$)表示。

$$R = (1 - \frac{N}{N_0}) \times 100\% \quad (1)$$

$$\lg S = \lg \frac{N}{N_0} \quad (2)$$

式中:*N*为热处理一段时间后剩余的活细胞数量;*N*₀为初始的活细胞数量。

1.5 热致死动力学模型

1.5.1 一级模型

将毕赤酵母残存对数为纵坐标,热处理时间为横坐标,绘制致死曲线,用Weibull模型进行拟合,Weibull模型为

$$\lg \frac{N}{N_0} = -bt^n \quad (3)$$

式中:*t*为热处理时间(min);参数*b*为模型尺度因子;参数*n*为曲线形状因子。当*n*=1时,曲线呈线性趋势;*n*>1时,曲线呈上凸状,表示死亡速率持续增加;*n*<1时,曲线呈凹状,表示细菌死亡速率逐渐减小,存活的细菌对环境压力产生一定抗性^[11]。

1.5.2 二级模型

建立不同变量(温度和菌体量)的与一级失活模型参数(Weibull模型中的*b*和*n*)之间的多元回归方程,将响应值即参数*b*和*n*进行适当的对数或平方根变换。

多元回归模型为

$$y = b_0 + \sum_{j=1}^k b_j x_j + \sum_{j=1}^k b_{jj} x_j^2 + \sum_{j<l}^k \sum_{l} b_{jl} x_j x_l + e \quad (4)$$

式中:*y*为*b*或*n*的响应值;*b*₀、*b*_{*j*}、*b*_{*jj*}、*b*_{*jl*}为不同的常量系数;*x*_{*j*}、*x*_{*l*}为编码的变量温度和菌体量。

1.6 实验数据分析和模型验证

应用Sigmaplot 12.5软件对毕赤酵母在不同处理条件下的致死曲线数据进行分析 and 模型拟合。采用参数*R*²、*Af*、*Bf*、*RMSE*、*SSE*评价模型拟合度^[12]。当*R*²越接近1时,表示相关的预测模型参考价值越高;*Af*为准确因子,反映了预测值和实际值的偏离程度,

Af 值越小,表明模型预测值与真实值越接近,模型的精确程度越高; Bf 为偏差因子, Bf 越接近 1,模型拟合度越高;均方根误差 ($RMSE$) 可作为衡量预测准确度指标,可以反映模型预测的离散程度;误差平方和 SSE 值越小,模型精确度越高.

$$R^2 = 1 - \frac{SSE}{SST} \quad (5)$$

$$SSE = \sum (\mu_0 - \mu)^2 \quad (6)$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum (\mu_0 - \mu)^2}{n}} \quad (7)$$

$$Bf = 10^{\left(\frac{\sum \lg(\mu/\mu_0)}{n}\right)} \quad (8)$$

$$Af = 10^{\left(\frac{\sum |\lg(\mu/\mu_0)|}{n}\right)} \quad (9)$$

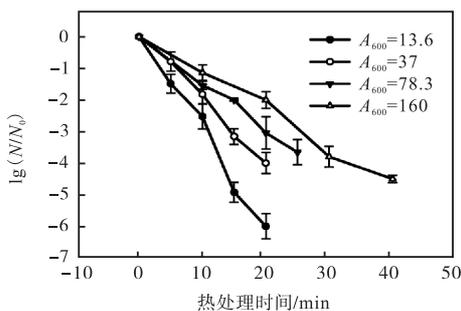
式中: SSE 为误差平方和; SST 为总离差平方和; μ_0 为实验观测值; μ 为预测值; n 为观测值个数.

2 结果与分析

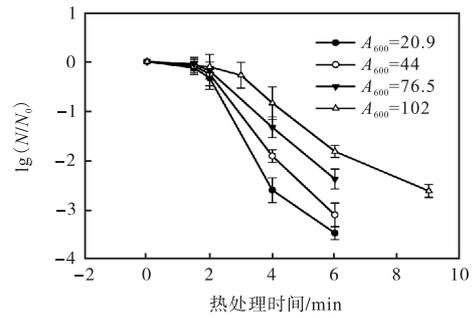
2.1 温度、作用时间及不同菌体量下的毕赤酵母致死规律

毕赤酵母对高温敏感,在 32 °C 以上生长则不利于蛋白的表达,一般在 45 °C 时就停止生命活动,致死温度一般在 50 ~ 60 °C^[13]. 且温度越高致死速率越快. 菌体量对致死速率同样有着影响,单位体积的细胞越多,致死所需要的热量就越多,且菌液的热传递效果越差,这样同样条件下的致死率越低.

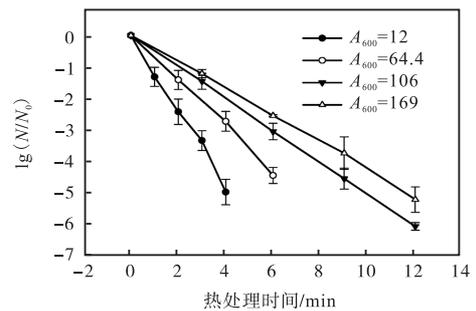
以热处理时间为横坐标,毕赤酵母残存对数为纵坐标,绘制特定温度和特定菌体量(吸光度)的致死曲线,如图 1 所示. 毕赤酵母残存的细胞量的对数随着热处理时间的延长而降低,同时,随着温度的升高毕赤酵母的死亡速率也随之加快. 相同温度处理下的致死曲线趋势大致相似,菌液的浓度越大,致死曲线的位置就更加靠后,达到相同灭菌效率的时间越长.



(a) 50 °C



(b) 55 °C



(c) 60 °C

图 1 热处理不同毕赤酵母浓度的致死曲线

Fig. 1 Thermal inactivation curve of *Pichia pastoris* with different amount of cell mass

随着处理温度的升高,致死曲线的形状趋于直线. 温度较低的 50 °C 下处理的致死曲线是“S”形的,在热处理开始和结束时的曲线平缓. 而在 60 °C 下处理的致死曲线的形状类似一条直线,没有明显的滞后和拖尾的现象.

2.2 毕赤酵母的一级热致死动力学模型

一级模型是一个数学方程或数学函数,用来表示微生物数量与时间的关系. 在微生物的动力学研究中,失活规律通常是非线性的,在早期的研究中曾经提出对数残留定律,既微生物的热致死的对数曲线为直线. 但是,在很多情况下灭活曲线并不遵循这种关系,而是存在“肩部”或“拖尾”现象^[14]. 因为微生物菌群里含有很多独立的群体,而残存曲线是菌群各自动力学模式的综合体现^[15]. 因此有研究将失活曲线看作概率模型^[16]. 例如有研究发现,单增李斯特菌在高压协同温度处理时的失活模型可以用 log-logistic 模型来拟合^[17],改进的 Gompertz 模型能很好地预测细菌的热灭活趋势^[18],Albert 等^[19]利用设计的 Weibull 模型成功拟合了预测细菌的灭活规律. 但這些热灭活模型研究的微生物主要是食源性的致病细菌,对于广泛使用的温敏型工程菌毕赤酵母这一真菌研究较少.

其中 Weibull 分布函数被广泛应用于微生物存

活数据的分析,近年来,Weibull模型已经成功拟合了很多微生物的非线性热失活模型曲线^[14,20].将热处理后的毕赤酵母残存数据,采用Weibull模型进行曲线拟合,得到的相关数据见表1.拟合方程中 $n > 1$,即所有毕赤酵母的致死曲线呈上凸的形状,这表明在初始阶段随着加热时间的延长,致死速率也随之加快,出现“肩部”情况;在热处理后期,致死速率却变慢.这种情况在较低温度处理下更加明显.这是

由于在初始阶段,菌液处于升温阶段,热量没有传递均匀,此时的热处理对部分细胞没有很大影响.待温度平衡,致死速率也趋于稳定,随着时间的延长,毕赤酵母对高温出现了一定的耐受性,体现在致死曲线上就是“拖尾”.模型的决定系数 R^2 为0.9609~0.9999,同时SSE较小, $P < 0.001$,表明Weibull模型表现出较好的拟合度,拟合所得到的结果接近于实验真实值.

表1 热处理条件下毕赤酵母致死曲线拟合方程及相关系数

Tab. 1 Fitting equation and correlation coefficients of *Pichia pastoris* under heat treatment

热处理温度/°C	菌体量 A_{600}	拟合方程 $\lg(N/N_0) = -bt^n$	R^2	SSE	P
50	13.6	$\lg(N/N_0) = -0.2395 t^{1.0836}$	0.9853	0.3549	<0.0001
	37	$\lg(N/N_0) = -0.1414 t^{1.1238}$	0.9950	0.0541	<0.0001
	78.3	$\lg(N/N_0) = -0.1373 t^{1.0214}$	0.9929	0.0568	<0.0001
	160	$\lg(N/N_0) = -0.1006 t^{1.0388}$	0.9844	0.2150	<0.0001
55	20.9	$\lg(N/N_0) = -0.2447 t^{1.5130}$	0.9369	0.6550	<0.0001
	44	$\lg(N/N_0) = -0.1450 t^{1.7272}$	0.9950	0.0541	<0.0001
	76.5	$\lg(N/N_0) = -0.0889 t^{1.8461}$	0.9832	0.0727	<0.0001
	102	$\lg(N/N_0) = -0.0998 t^{1.5069}$	0.9609	0.2189	<0.0001
60	12	$\lg(N/N_0) = -1.1696 t^{1.0145}$	0.9922	0.1100	<0.0001
	64.4	$\lg(N/N_0) = -0.6183 t^{1.0897}$	0.9999	0.0184	<0.0001
	106	$\lg(N/N_0) = -0.4879 t^{1.0106}$	0.9999	0.0031	<0.0001
	169	$\lg(N/N_0) = -0.3776 t^{1.0489}$	0.9993	0.0112	<0.0001

2.3 基于Weibull模型参数的二级模型的建立

由以上分析可知,温度对致死率的影响和菌体量对致死率的影响可以用Weibull模型来描述(拟合效果理想).但是Weibull模型的参数却随着温度和菌体量变化,因此需要建立一个温度和菌体量对一级模型参数影响的二级模型.采用多元回归方程拟合出模型为

$$\begin{aligned} \ln b &= 92.1340 - 3.5488x - 0.0163y + \\ & 0.0336x^2 + 5.5215 \times 10^{-5}y^2 \\ \ln n &= -51.9920 + 1.9103x + 0.0006y - \\ & 0.0174x^2 - 4.1679 \times 10^{-6}y^2 \end{aligned}$$

式中: x 为热处理的温度, y 为菌体量(吸光度); b 和 n 为Weibull模型的参数.两个模型的相关系数(R^2)分别为0.9741和0.9466,说明该模型所描述的温度和菌液吸光度与一级模型中的参数之间的关系是可信的.从拟合方程的系数上看,温度对一级模型参数的影响有较大的影响,其次是菌体量(吸光度).

2.4 毕赤酵母热致死模型的验证

对于验证一个模型是否有效,偏差因子和准确因子被认为作为首要的标准,且被证明是验证模型预测模型性能的非常有价值的工具.如果 Bf 值在0.9~1.05的范围之内,认为该模型能够很好地预测微生物

生长速度和生长状况;如果 Bf 值在0.7~0.9或者1.06~1.15范围之内,则该模型是可以被接受的;如果 Bf 值大于1.15或者小于0.7,则说明该模型是失败的^[21].偏差因子不能表示参数估计的平均准确性,因此常结合准确性因子(Af)对模型进行数学检测, Af 值越大表示平均准确性越低,而 Af 值等于1表示预测值与观测值之间完全吻合.

用53、57℃处理 A_{600} 分别为20、45、120的毕赤酵母菌液,验证热致死模型的可靠性.由表2可知, $RMES$ 、 Bf 、 Af 的值均在可靠范围,模型的准确性较高.并通过代入温度和菌体量数据到模型中,得到达到特定致死率的预测时间,表3列举的实验组和预测组所达到50%、90%、99%、99.9%致死率的时间相近,这亦说明本研究建立的毕赤酵母热致死模型是成功的.

实验中 A_{600} 为169,处理温度60℃,代入二级模型中可得到一级模型的参数 $b = 0.3636$, $n = 1.0321$.一级模型为 $\lg(N/N_0) = -0.3636t^{1.0321}$,代入99.99%致死率即 $\lg(N/N_0) = -4$,获得达到99.99%致死率的时间为14.6903 min,实际实验中60℃处理15 min的菌液,热处理完成后直接倾注的平板在30℃下培养96 h后平板上未见菌落形成.

表2 毕赤酵母热致死模型验证参数

Tab.2 Validation parameters of *Pichia pastoris* thermal death model

菌体量 A_{600}	热处理温度/°C	实验组数	RMSE	Bf	Af
20	53	6	0.120 8	1.004 3	1.042 7
	57				
45	53	6	0.067 0	0.980 7	1.032 7
	57				
120	53	6	0.072 1	0.966 2	1.052 0
	57				

表3 验证实验的观测值及模型的预测值

Tab.3 Verified results of independent trials and the model

菌体量 A_{600}	热处理温度/°C	$t_{50\%/min}$	$t_{90\%/min}$	$t_{99\%/min}$	$t_{99.9\%/min}$
20	53	1.578*	3.567*	5.710*	7.518*
		1.667	3.633	5.750	7.417
	57	1.060*	2.423*	3.906*	5.165*
		1.100	2.417	4.917	5.200
45	53	1.949*	4.372*	6.971*	9.159*
		1.967	4.333	6.950	9.133
	57	1.316*	2.989*	4.799*	6.331*
		1.317	2.967	4.667	6.367
120	53	2.820*	6.362*	10.175*	13.392*
		2.750	6.417	10.250	12.967
	57	1.911*	4.362*	7.026*	9.286*
		1.967	4.333	6.983	9.167

注:带*的数值为预测值; $t_{50\%}$ 、 $t_{90\%}$ 、 $t_{99\%}$ 、 $t_{99.9\%}$ 分别为毕赤酵母达到50%、90%、99%、99.9%致死率的时间。

3 结 语

本研究采用 Weibull 模型对毕赤酵母的热致死曲线进行拟合,并且建立了温度和菌体量(吸光度)对一级模型参数影响的二级模型,结果表明此模型能够较准确地模拟毕赤酵母的热致死规律. 这为实际生产中热处理毕赤酵母菌液提供了一定的理论依据.

参考文献:

[1] Ahmad M, Hirz M, Pichler H, et al. Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2014, 98(12): 5301–5317.

[2] 朱泰承, 李寅. 毕赤酵母表达系统发展概况及趋势[J]. 生物工程学报, 2015, 31(6): 929–938.

[3] Macauley-Patrick S, Fazenda M L, McNeil B, et al. Heterologous protein production using the *Pichia pas-*

toris expression system[J]. Yeast, 2005, 22(4): 249–270.

[4] 陈瑞东. N-酰基高丝氨酸内酯酶基因克隆、表达、性质研究与水产养殖应用[D]. 北京: 中国农业科学院, 2010.

[5] 许英蕾, 孙建义, 刘明启. 巴斯德毕赤酵母表达系统及其在饲料添加剂开发上的应用前景[J]. 饲料工业, 2005, 26(2): 40–42.

[6] 丁嘉烽. 巴斯德毕赤酵母表达系统在动物传染病防制中应用的研究进展[J]. 当代畜牧, 2013, 38(14): 89–90.

[7] 杨楠桢. 生物性污染废水处理技术研究[D]. 上海: 复旦大学, 2010.

[8] Sree N K, Sridhar M, Suresh K, et al. Isolation of thermotolerant, osmotolerant, flocculating *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production[J]. Bioresource Technology, 2000, 72(1): 43–46.

[9] 路福平, 杨华, 王玉, 等. 高温和 H_2O_2 诱导酵母细胞产生活性衍生物的研究[J]. 微生物学通报, 2004, 31(5): 28–32.

[10] 中华人民共和国卫生部. GB 4789.15—2010 食品安全国家标准·食品微生物学检验·霉菌和酵母计数[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.

[11] Chen H, Hoover D G. Use of Weibull model to describe and predict pressure inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A in whole milk[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2004, 5(3): 269–276.

[12] 王军, 董庆利, 丁甜. 预测微生物模型的评价方法[J]. 食品科学, 2011, 32(21): 268–272.

[13] Li P, Anumanthan A, Gao X, et al. Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2007, 142(2): 105–124.

[14] Boekel M A J S. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells[J]. International Journal of Food Microbiology, 2002, 74(1/2): 139–159.

[15] Doyle M E, Mazzotta A S, Wang T, et al. Heat resistance of *Listeria monocytogenes*[J]. Journal Food Protection, 2001, 64(3): 410–429.

[16] 董庆利. Weibull 模型拟合细菌非线性失活曲线的应用研究[J]. 上海理工大学学报, 2009, 31(4): 387–391.

[17] Chen H, Hoover D G. Modeling the combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on the inactiva-

- tion kinetics of *Listeria monocytogenes* Scott A in whole milk[J]. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2003, 4(1): 25–34.
- [18] Gil M M, Brandão T R S, Silva C L M. A modified Gompertz model to predict microbial inactivation under time-varying temperature conditions[J]. *Journal of Food Engineering*, 2006, 76(1): 89–94.
- [19] Albert I, Mafart P. A modified Weibull model for bacterial inactivation[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 100(1/2/3): 197–211.
- [20] Buzrul S, Alpas H, Bozoglu F. Use of Weibull frequency distribution model to describe the inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* by high pressure at different temperatures[J]. *Food Research International*, 2005, 38(2): 151–157.
- [21] Ross T, McMeekin T A, Baranyi J. Predictive microbiology and food safety[M]//Tortorello C A B L. *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2nd ed. Oxford: Academic Press, 2014: 59–68.

责任编辑: 郎婧

(上接第23页)

- [5] Monika K, Rao D M, Anuraj N, et al. Ligand-binding site analysis of 2-amino-5-chlorophenol 1,6-dioxygenase from *Comamonas* sp. CNB-1 by molecular modelling and docking[J]. *Online Journal of Bioinformatics*, 2010, 11(2): 302–316.
- [6] Li D F, Zhang J Y, Hou Y J, et al. Structures of aminophenol dioxygenase in complex with intermediate, product and inhibitor[J]. *Acta Crystallographica*, 2013, 69(1): 32–43.
- [7] Li D F, Zhang J Y, Hou Y, et al. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of 2-aminophenol 1,6-dioxygenase complexed with substrate and with an inhibitor[J]. *Acta Crystallographica*, 2012, 68(11): 1337–1340.
- [8] Zhang G, Yu D, Yang G, et al. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the hypothetical deaminase RPB_0146 from *Rhodopseudomonas palustris* HaA2[J]. *Acta Crystallographica*, 2014, 70(11): 1560–1562.
- [9] Zhen D, Liu H, Wang S J, et al. Plasmid-mediated degradation of 4-chloronitrobenzene by newly isolated *Pseudomonas putida* strain ZWL73[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2006, 72(4): 797–803.
- [10] Otwinowski Z, Minor W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode[J]. *Methods in Enzymology*, 1997, 276(97): 307–326.
- [11] Terwilliger T C. Maximum-likelihood density modification using pattern recognition of structural motifs[J]. *Acta Crystallographica*, 2001, 57(12): 1755–1762.
- [12] Marchler-Bauer A, Zheng C, Chitsaz F, et al. CDD: Conserved domains and protein three-dimensional structure[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(Database issue): D348–D352.
- [13] Araújo S S D, Neves C M L, Guimarães S L, et al. Structural and kinetic characterization of recombinant 2-hydroxymuconate semialdehyde dehydrogenase from *Pseudomonas putida* G7[J]. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 2015, 579: 8–17.
- [14] Gouet P, Robert X, Courcelle E. ESPript/ENDscript: Extracting and rendering sequence and 3D information from atomic structures of proteins[J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(13): 3320–3323.
- [15] Lu H, Davis I, Liu F, et al. Crystallographic and spectroscopic snapshots reveal a dehydrogenase in action[J]. *Nature Communications*, 2015(6): 5935–5945.

责任编辑: 郎婧