



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20170190

数字出版日期: 2018-11-27; 数字出版网址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/12.1355.N.20181127.1133.004.html>

肺炎克雷伯氏菌漆酶基因的克隆及其在 毕赤酵母中的高效表达

王建玲, 桂爽, 付禹, 张舒彤, 郑东, 路福平, 刘逸寒

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津市工业微生物重点实验室, 工业酶国家工程实验室,
天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 以肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)基因组为模板,通过PCR扩增得到其漆酶基因*lac*;基于毕赤酵母密码子偏爱性优化后,得到新型漆酶基因*lacm*;将其与大肠杆菌-毕赤酵母(*E. coli-P. pastoris*)穿梭表达载体pPIC9K连接,构建重组质粒pPIC9K-*lacm*;将该质粒转化毕赤酵母(*Pichia pastoris*)GS115中,实现该漆酶的胞外分泌表达,发酵液中重组漆酶(rLACM)活力达0.37 U/mL. 经对rLACM酶学性质分析表明:rLACM的最适温度为70℃,最适pH为8.0,在30~70℃、pH 5.0~9.0活力稳定.

关键词: 漆酶; 毕赤酵母; 异源表达; 酶学性质

中图分类号: Q814.4

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2019)01-0012-06

Cloning of the Laccase Gene from *Klebsiella pneumoniae* and its Efficient Expression in *Pichia pastoris*

WANG Jianling, GUI Shuang, FU Yu, ZAHNG Yutong, ZHENG Dong, LU Fuping, LIU Yihan

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, National Engineering Laboratory for Industrial Enzymes, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The gene of *lac* was obtained from the genomic DNA of *Klebsiella pneumoniae* through PCR amplification. A novel laccase gene *lacm* was obtained based on the yeast codon bias optimization. It was inserted into an *E. coli-P. pastoris* shuttle vector pPIC9K to construct recombinant plasmid pPIC9K-*lacm*. The recombinant plasmid was then transformed into *Pichia pastoris* GS115. The recombinant laccase was successfully expressed in *P. pastoris* and secreted into the culture medium. In optimized fermentation conditions, the activity of the recombinant laccase (rLACM) in fermentation broth was up to 0.37 U/mL. The optimal enzyme activity of rLACM was observed at pH 8.0 and 70 °C temperature. Stability studies showed that rLACM was stable when temperature was 30-70 °C and pH 5.0-9.0.

Key words: laccase; *Pichia pastoris*; heterologous expression; enzyme property

漆酶(laccase, EC 1.10.3.2),又称漆酚氧化酶、多铜氧化酶,是一种含铜的多酚氧化酶,属于铜蓝氧化酶蛋白家族的一员^[1-2]. 漆酶的作用底物较为广泛,能够催化包括多酚类、二胺、芳胺类、羧酸类在内的250多种有机物发生氧化、聚合等反应. 由于漆酶具有特殊的催化性能和宽泛的作用底物,因此其应用较

为广泛,包括纺织业中的染料脱色、造纸工业中的生物漂白、食品行业中食品风味改良、检测酚类污染物生物传感器的构建和生物电子研发等^[3-6]. 部分上述工业过程需要在高温、强酸、强碱等恶劣条件下进行,因此,需要漆酶具有较好的温度和pH稳定性^[7].

漆酶主要存在于植物、真菌、少数昆虫和细菌

收稿日期: 2017-07-02; 修回日期: 2017-11-24

基金项目: 天津市科技计划资助项目(16YFZCSY01040,17JCYBJC23700); 大学生实验室创新基金资助项目(1604A207)

作者简介: 王建玲(1962—),女,天津人,研究员; 通信作者: 刘逸寒,副教授,lyh@tust.edu.cn

中,其中真菌漆酶来源最为广泛,研究较为深入的真菌漆酶主要来自白腐真菌(*C. thermophilum*)^[8]、射脉菌(*Phlebia radiata*)^[9]、云芝栓孔菌(*Trametes versicolor*)^[10]、鲜红密孔菌(*Pycnoporus cinnabarinus*)^[11]、糙皮侧耳(*P. ostreatus*)^[12]、毛木耳(*Auricularia polytricha*)^[13]和黑木耳(*Auricularia auricula*)^[14]等。目前,关于真菌漆酶的研究众多,但其存在碱性条件下活性较低、热稳定性较差和丝状真菌生长周期长等缺点。细菌漆酶来源较少,目前已在生脂固氮螺菌(*Azospirillum lipoferum*)^[15]、链霉菌(*Streptomyces*)^[16]、球形芽胞杆菌(*Bacillus sphaericus*)^[17]、枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)^[18]、嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*)^[19]及肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)^[20]等细菌中发现过漆酶活性。与真菌来源漆酶相比,细菌漆酶在碱性条件下具有较好的催化活性和稳定性及存在 Cu²⁺抗性等优点^[21-23]。以 2,6-DMP 为底物时,细菌漆酶的最适温度一般在 60~65℃,最适 pH 一般为 7.0~8.0,在 25~60℃和 pH 6.0~9.0 范围内稳定性较好^[24-27]。另外,黄俊等^[20]筛选获得一株产漆酶菌 *Klebsiella* sp. 601,以 2,6-DMP 为底物时,该漆酶在 pH 5.0~8.0 条件下较稳定,在 pH 3.0~4.0、pH 9.0~10.0 条件下,几乎没有残余酶活力。本实验室前期从中国西双版纳土壤中筛选获得一株含漆酶基因(*lac*)的肺炎克雷伯氏菌^[28],*lac* 基因与上述 *Klebsiella* sp. 601 来源漆酶基因相比,共有 18 个不同氨基酸,该漆酶以 2,6-DMP 为底物时,在 pH 5.0~9.0 条件下较稳定,在 pH 3.0~4.0、pH 10.0~11.0 条件下,其残余酶活力在 20% 以上,在 30~70℃条件下较稳定,其残余酶活力在 40% 以上,表明该漆酶具有良好的 pH 和温度稳定性,但由于是在大肠杆菌中表达,难以实现高效合成。

本研究旨在通过构建前期筛选获得的具有良好酶学特性的 *lac* 毕赤酵母重组菌株,实现该重组漆酶的高效分泌表达,为其应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒

肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*) TCCC111142、质粒 pUC57-*lacm*(根据毕赤酵母的密码子偏爱性优化的漆酶基因 *lacm* 克隆入 pUC57 中,由北京六合华大基因科技有限公司合成)、大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、毕赤酵母(*Pichia pastoris*)

GS115、质粒 pPIC9K 均为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂与工具酶

Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶 *EcoR* I、*Not* I, Takara 公司;质粒快速提取试剂盒和 DNA 纯化回收试剂盒, Omega 公司;蛋白胨和酵母浸粉, Oxoid 公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养基

LB 固体培养基(g/L): 酵母提取物 5.0, 胰蛋白胨 10.0, NaCl 10.0, 琼脂 15。

YPD 固体培养基(g/L): 酵母提取物 10, 蛋白胨 20, 葡萄糖 20, 琼脂 20。

BMGY 液体培养基(g/L): 酵母提取物 10, 蛋白胨 20, YNB 13.4, 甘油 5, 生物素 0.04; 1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.0) 100 mL。

BMMY 液体培养基(g/L): 酵母提取物 10, 蛋白胨 20, YNB 13.4, 加入生物素 0.04; 1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.0) 100 mL, 每日补加甲醇 5 mL。

MD 培养基(g/L): 葡萄糖 20, 琼脂 15, YNB 13.4, 生物素 0.04。

1.2 方法

1.2.1 肺炎克雷伯氏菌漆酶基因扩增

通过 NCBI 基因库查找,根据已报道的肺炎克雷伯氏菌漆酶成熟肽基因,分析其保守序列,设计 TCCC111142 成熟肽编码基因的扩增引物,上游引物 P1: 5'-CCGGAATTCCAACGTCGAGACTTCCTCA A-3'(下划线部分为加入的 *EcoR* I 酶切位点),下游引物 P2: 5'-ATAAGAATGCGGCCGCTTAGTGGTGTGGTGGTGGTGAACCGTGAACCCCAAC-3'(单下划线部分为加入的 *Not* I 酶切位点,双下划线部分为添加的 6 个组氨酸标签,方便纯化蛋白)。

以肺炎克雷伯氏菌基因组为模板,以 P1 和 P2 为引物,进行 PCR 扩增。扩增条件为: 95℃ 预变性 10 min; 95℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 1 min 40 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。

将 PCR 扩增产物进行测序后,获得 *lac* 基因序列,根据毕赤酵母的密码子偏爱性优化该基因,由北京六合华大基因科技有限公司进行合成,得到新型漆酶基因 *lacm*。

1.2.2 重组质粒的构建

重组质粒 pUC57-*lacm* 和质粒 pPIC9K 经 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切并纯化回收后,用 T4 DNA 连接酶连接,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,经氨苄青霉素(Amp)抗性筛选,挑选阳性转化子;提取质粒,并进行酶切验证。

1.2.3 电转化毕赤酵母

提取重组菌质粒 pPIC9K-*lacm*, 用 *Sac* I 酶切线性化并进行纯化回收; 制备毕赤酵母 GS115 的感受态细胞; 然后采用电转化法将线性化的重组质粒 pPIC9K-*lacm* 转化到毕赤酵母 GS115, 将电转液涂布于 MD 平板, 30 °C 静置培养至转化子出现。

1.2.4 酵母转化子 PCR 鉴定

从 MD 平板上挑选转化子提取基因组, 以其基因组为模板, 用上述 *lacm* 基因特异引物进行 PCR 反应, 凝胶电泳检测 *lacm* 基因是否插入到毕赤酵母 GS115 的染色体上。

1.2.5 漆酶在毕赤酵母中的诱导表达

选择 PCR 鉴定为阳性的菌落 GS115/pPIC9K-*lacm* 和转有空质粒的对照菌株 GS115/pPIC9K 接种至 YPD 液体培养基中, 30 °C、220 r/min 培养 24 h。以 3% 的接种量转接到新鲜 BMGY 培养基中, 继续以 30 °C、220 r/min 培养 24 h, 然后以 6 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 将菌体转接到 BMMY 培养基中。再以 30 °C、220 r/min 培养, 并每隔 12 h 补加一次甲醇, 使其终体积分数保持在 0.5%, 培养 120 h 后可得到重组漆酶 (rLACM) 的粗酶液。

1.2.6 纯化 rLACM

采用镍柱纯化亲和层析法纯化 rLACM, 步骤如下: 将含有 Ni 树脂装入合适的纯化柱中, 树脂体积为 2 mL; 用预冷的 Lysis Buffer 缓冲溶液平衡树脂 2~5 个床体积; 将平衡后的树脂与经过膜 (0.22 μm) 过滤的粗酶液混合, 在 4 °C 条件下通过磁力搅拌器使二者结合 40~60 min; 将树脂与粗酶液的结合液过柱; 加入预冷的 Wash Buffer 缓冲溶液 20 mL, 进行清洗杂蛋白; 用 500 mmol/L 咪唑的 Elution Buffer 缓冲溶液 5 mL 进行洗脱, 用于 SDS-PAGE 检测目标蛋白的相对分子质量和纯度。

1.2.7 表达产物的 SDS-PAGE 分析

重组菌株 GS115/pPIC9K-*lacm* 和对照菌 GS115/pPIC9K 在 30 °C 诱导培养结束后, 取 1 mL 发酵液离心去除菌体, 取上清液和纯化后 rLACM 各 40 μL 进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.8 漆酶活力测定及酶学性质考察

取 200 μL 的含 4 mmol/L Cu^{2+} 的 0.1 mol/L 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液 (pH 2~8) 或者含 4 mmol/L Cu^{2+} 的 0.05 mol/L 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液 (pH 8.5~11), 于 96 孔板中, 70 °C 保温 1 min。加入 10 μL 的稀释适当倍数的纯酶液, 混匀, 70 °C 保温 1 min。再加入 30 μL 的底物 (8 mmol/L 的 2, 6-DMP), 混匀, 记

录反应初始吸光度和反应 3 min 时吸光度。在一定的条件下, 每分钟氧化 1 μmol 的 2, 6-DMP 所需要的酶量定义为一个酶活力单位 (U)。

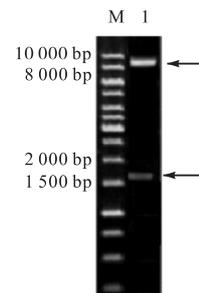
用 pH 8.0 的磷酸缓冲溶液配制漆酶的 2, 6-DMP 底物, 分别在 20~100 °C 测定其酶活力, 确定 rLACM 的最适温度。将酶液置于 pH 8.0 缓冲液, 在 30~80 °C 温浴, 每隔 1 h 取样, 在最适反应条件下测定其酶活力, 考察其温度稳定性。

分别用 pH 为 2.0~11.0 的磷酸缓冲溶液配制漆酶底物 2, 6-DMP, 在 70 °C 反应下, 确定 rLACM 的最适 pH。将酶液置于 pH 3.0~10.0 缓冲液, 于 70 °C 保温 35 h, 每隔 5 h 测定 rLACM 酶活力, 考察其 pH 稳定性。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pPIC9K-*lacm* 的构建

以肺炎克雷伯氏细菌的基因组为模板, 以引物 P1 和 P2 扩增目的基因 *lac*。在 *lac* 基因序列基础上, 基于毕赤酵母密码子偏爱性, 优化合成获得 *lacm* 基因, 与 *lac* 相比, 共改变 406 个碱基, GC 含量由 61.3% 变为 48.4%。重组质粒 pUC57-*lacm* 与质粒 pPIC9K 均经 *Eco*R I 和 *Not* I 双酶切后连接, 转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中, 经 Amp 抗性筛选, 挑选阳性转化子, 提取质粒并进行酶切验证。如图 1 所示, 经过 *Eco*R I 和 *Not* I 双切, 重组质粒产生约 1 600 bp 和 9 300 bp 的两条带, 与预计大小相符, 证明重组质粒构建成功。



M. DNA marker; 1. pPIC9K-*lacm*/*Eco*R I-*Not* I

图 1 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 1 Enzyme digestion identification of recombinant plasmid

2.2 重组质粒电转及转化子鉴定

将重组质粒 pPIC9K-*lacm* 线性化后电转毕赤酵母 GS115 感受态, 将电转液涂布于 MD 平板。从 MD 平板上挑选转化子, 提取基因组, 进行 PCR 验证。如

图2所示,得到一条约1600 bp的条带,证明 *lacm* 插入到毕赤酵母染色体中,成功构建重组菌株 GS115/pPIC9K-*lacm*.



M. DNA marker; 1. PCR 扩增产物

图2 GS115/pPIC9K-*lacm* 的 PCR 扩增结果

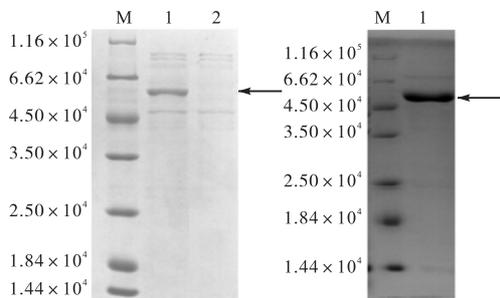
Fig. 2 PCR amplification results of GS115/pPIC9K-*lacm*

2.3 rLACM的诱导表达及纯化

对照菌株 GS115/pPIC9K 和重组菌 GS115/pPIC9K-*lacm* 经甲醇诱导发酵 120 h 后,离心得到发酵上清液.以 2,6-DMP 为漆酶底物时,测得 rLACM 的酶活力达到 0.37 U/mL,而嗜热栖热菌来源的热稳定性好的漆酶酶活力约为 0.022 U/mL,嗜盐菌 *Chromohalobacter salexigens* 来源的漆酶活力达到 0.14 U/mL^[25, 29].

对 rLACM 进行 SDS-PAGE 分析,如图 3(a)所示,GS115/pPIC9K-*lacm* 与 GS115/pPIC9K 相比,在相对分子质量 5.8×10^4 左右多出一条带,与预期 rLACM 大小一致,以上说明 GS115/pPIC9K-*lacm* 成功高效分泌表达 rLACM.

如图 3(b)所示,使用镍柱亲和层析法纯化 rLACM,并进行 SDS-PAGE 分析,有一条单一条带,其相对分子质量约为 5.8×10^4 ,可用于后续的酶学性质研究.



(a) 诱导表达

(b) 纯化

(a) 中 M. protein marker; 1. GS115/pPIC9K-*lacm* 发酵上清液; 2. GS115 发酵上清液. (b) 中 M. protein marker; 1. 纯化后 rLACM

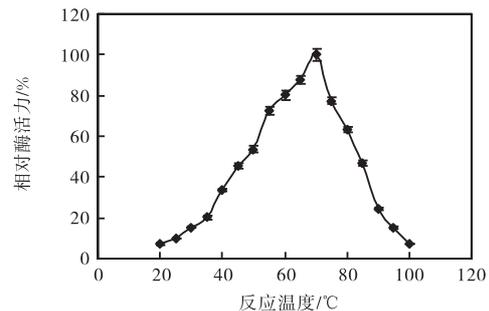
图3 rLACM的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the rLACM

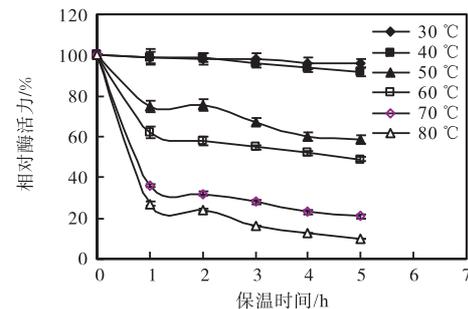
2.4 rLACM的酶学性质

2.4.1 rLACM 的最适温度和温度稳定性

rLACM 的最适温度和温度稳定性如图 4 所示. rLACM 的最适反应温度为 70 °C,在 30 ~ 90 °C 范围内具有酶活性.对 rLACM 的热稳定性进行分析,其在 30 °C 和 40 °C 条件下保温 5 h,酶活力可维持在 95% 左右;在 50 °C 和 60 °C 条件下保温 5 h,酶活力仍在 50% 以上;在 80 °C 条件下保温 1 h,残余活力为 25% 左右.



(a) 最适反应温度



(b) 温度稳定性

图4 rLACM的最适温度和温度稳定性

Fig. 4 Optimum temperature and thermostability for rLACM

由此可见, rLACM 的热稳定性能比真菌中的米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 以及细菌中的嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 的漆酶热稳定性能更加稳定^[30-31]. 另外,黄俊等^[20]报道的肺炎克雷伯氏菌 601 (*Klebsiella sp. 601*) 来源漆酶在 80 °C 处理 30 min,则完全失活;而 rLACM 在 80 °C 条件下保温 1 h,残余活力为 25% 左右. 这表明 rLACM 具有较好的热稳定性.

2.4.2 rLACM 的最适 pH 和 pH 稳定性

rLACM 的最适 pH 和 pH 稳定性如图 5 所示. rLACM 的最适 pH 为 8.0,在 pH 7.0 ~ 9.0 的范围内具有酶活性.对 rLACM 的 pH 稳定性进行分析,其在 pH 7.0 和 pH 8.0 的条件下保温 35 h,其残余活

力在 70% 以上. 在 pH 5.0 和 pH 6.0 以及 pH 8.0 和 pH 9.0 的条件下保温 20 h, 其残余活力在 60% 以上, 而黄俊等^[20]报道 *Klebsiella* sp.601 来源漆酶在 pH 8.0 和 pH 9.0 条件下保温 24 h 残余酶活力分别为 55% 和 10% 左右. 此外, 在 pH 4.0、pH 10.0 的条件下保温 20 h, 其残余活力仍分别保持在 41% 和 35%. 该结果表明, rLACM 具有较宽的 pH 稳定范围.

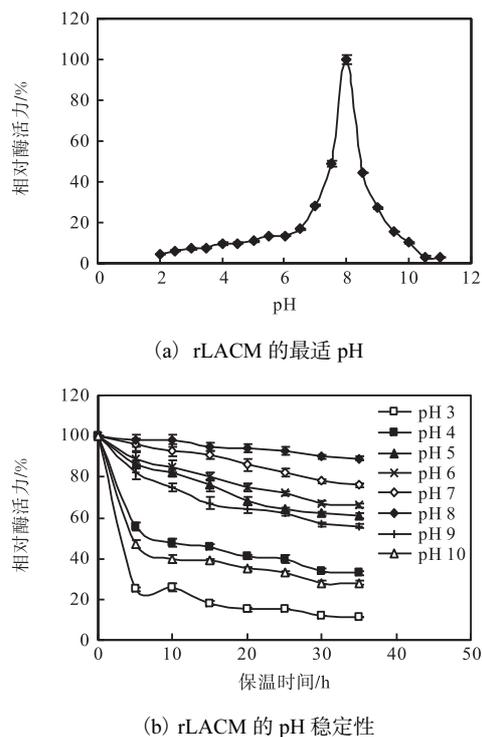


图 5 rLACM 的最适 pH 和 pH 稳定性

Fig. 5 Optimum pH and pH stability for rLACM

由上述研究表明, rLACM 与目前报道的细菌来源漆酶相比, 兼具较好的热稳定性及较宽的 pH 稳定范围; 同时, 经在毕赤酵母中表达 *lacm* 基因获得的 rLACM, 其酶学性质与在大肠杆菌中表达的重组漆酶^[24]相似, 说明表达宿主的改变并未影响漆酶的特性, 从而可以通过毕赤酵母表达系统制备该性能优良的 rLACM.

3 结 语

本研究以肺炎克雷伯氏菌的基因组为模板, 通过 PCR 扩增得到其漆酶基因 *lac*, 基于毕赤酵母密码子偏爱性优化后得到新型漆酶基因 *lacm*, 并成功构建重组菌株 GS115/pPIC9K-*lacm*, 以 2, 6-DMP 为底物, 发酵液中的酶活力达到 0.37 U/mL, 实现肺炎克雷伯氏菌漆酶的高效分泌表达. 经酶学性质分析表

明, 以 2, 6-DMP 为底物时, rLACM 的最适温度为 70 °C, 最适 pH 为 8; 在 30 ~ 70 °C、pH 5.0 ~ 9.0 活力稳定. 该 rLACM 表现出的良好的酶学特性为漆酶的应用奠定了基础.

参考文献:

- [1] Strong P, Claus H. Laccase: A review of its past and its future in bioremediation[J]. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2011, 41(4): 373-434.
- [2] Hoshida H, Nakao M, Kanazawa H, et al. Isolation of five laccase gene sequences from the white-rot fungus *Trametes sanguinea* by PCR, and cloning, characterization and expression of the laccase cDNA in yeasts [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2001, 92(4): 372-380.
- [3] Bajpai P. Application of enzymes in the pulp and paper industry[J]. Biotechnology Progress, 1999, 15(2): 147-157.
- [4] Bourbonnais R, Paice M G, Freiermuth B, et al. Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds[J]. Applied & Environmental Microbiology, 1997, 63(12): 4627-4632.
- [5] Ghindilis A. Direct electron transfer catalysed by enzymes: Application for biosensor development[J]. Biochemical Society Transactions, 2000, 28(2): 84-89.
- [6] Katz E, Filanovsky B, Willner I. A biofuel cell based on two miscible solvents and glucose oxidase and micro-oxidase-11 monolayer-functionalized electrodes[J]. New Journal of Chemistry, 1999, 23(5): 481-487.
- [7] Lu L, Wang T N, Xu T F, et al. Cloning and expression of thermo-alkali-stable laccase of *Bacillus licheniformis* in *Pichia pastoris* and its characterization[J]. Bioresource Technology, 2103, 134(5): 81-86.
- [8] 许颖, 兰进. 真菌漆酶研究进展[J]. 食用菌学报, 2005, 12(1): 57-64.
- [9] Jordaan J, Leukes W D. Isolation of a thermostable laccase with DMAB and MBTH oxidative coupling activity from a mesophilic white rot fungus[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 33(2/3): 212-219.
- [10] Jönsson L, Sjöström K, Hoggström I, et al. Characterization of a laccase gene from the white-rot fungus *Trametes versicolor* and structural features of basidiomycete laccases[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1995, 1251(2): 210-215.

- [11] Eggert C, Lafayette P R, Temp U, et al. Molecular analysis of a laccase gene from the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*[J]. Applied & Environmental Microbiology, 1998, 64(5): 1766-1772.
- [12] Giardina P, Cannio R, Martitrani L, et al. Cloning and sequencing of a laccase gene from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*[J]. Applied & Environmental Microbiology, 1995, 61(6): 2408-2413.
- [13] 杨建明, 孟鑫, 徐鑫, 等. 毛木耳漆酶基因的克隆、测序分析及鉴定[J]. 微生物学通报, 2008, 35(11): 1708-1714.
- [14] 高键, 李杰. 黑木耳漆酶基因在毕赤酵母中的表达及其酶学性质研究[J]. 东北农业大学学报, 2009, 40(8): 58-62.
- [15] Givaudan A, Effosse A, Faure D, et al. Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere: Evidence for laccase activity in nonmotile strains of *Azospirillum lipoferum*[J]. FEMS Microbiology Letters, 1993, 108(2): 205-210.
- [16] Endo K, Hosono K, Beppu T, et al. A novel extracytoplasmic phenol oxidase of *Streptomyces*: Its possible involvement in the onset of morphogenesis[J]. Microbiology, 2002, 148(6): 1767-1776.
- [17] Claus H, Filip Z. The evidence of a laccase-like enzyme activity in a *Bacillus sphaericus* strain[J]. Microbiological Research, 1997, 152(2): 209-216.
- [18] Martins L O, Soares C M, Pereira M M, et al. Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat[J]. Journal Biological Chemistry, 2002, 277(21): 18849-18859.
- [19] Miyazaki K. A hyperthermophilic laccase from *Thermus thermophilus* HB27[J]. Extremophiles Life Under Extreme Conditions, 2005, 9(6): 415-425.
- [20] 黄俊, 王行国. *Klebsiella* sp. 601 细菌漆酶的鉴定及性质[J]. 化学与生物工程, 2006, 23(3): 31-34.
- [21] Hullo M F, Moszer I, Danchin A, et al. CotA of *Bacillus subtilis* copper-dependent laccase[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(18): 5426-5430.
- [22] Suzuki T, Endo K, Tsujubo H, et al. A thermostable laccase from *Streptomyces griseus* REN-7: Purification, characterization, nucleotide sequence and expression[J]. Bioscience Biochemistry, 2003, 67(10): 2167-2175.
- [23] Ruijsenaars H J, Hartmans S. A cloned *Bacillus halodurans* multi-copper oxidase exhibiting alkaline laccase activity[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 65(2): 177-182.
- [24] Brander S, Mikkelsen J D, Kepp K P. Characterization of an alkali- and halide-resistant laccase expressed in *E. coli*: CotA from *Bacillus clausii*[J]. PloS One, 2014, 9(6): e99402.
- [25] Jafari N, Rezaei S, Rezaie R, et al. Improved production and characterization of a highly stable laccase from the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens* for the efficient delignification of almond shell bio-waste[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 105(1): 489-498.
- [26] 赵秀艳, 常飞, 方泽民, 等. 黏细菌漆酶序列筛选及其重组酶学性质[J]. 生物工程学报, 2017, 33(4): 609-619.
- [27] 郭翔. *Kurthia huakuii* 漆酶基因的克隆表达、蛋白纯化与酶学特性研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2016.
- [28] Liu Y H, Huang L, Guo W, et al. Cloning, expression, and characterization of a thermostable and pH-stable laccase from *Klebsiella pneumoniae* and its application to dye decolorization[J]. Process Biochemistry, 2017, 53: 125-134.
- [29] 郑志强, 李华钟, 邵蔚蓝. 嗜热栖热菌热稳漆酶在大肠杆菌中的高效表达[J]. 工业微生物, 2013, 43(4): 1-8.
- [30] Wu J, Kim K S, Lee J H, et al. Cloning, expression in *Escherichia coli*, and enzymatic properties of laccase from *Aeromonas hydrophila* WL-11[J]. Journal of Environmental Sciences, 2010, 22(4): 635-640.
- [31] Nguyen L N, Hai F I, Dossetob A, et al. Continuous adsorption and biotransformation of micropollutants by granular activated carbon-bound laccase in a packed-bed enzyme reactor[J]. Bioresource Technology, 2016, 210: 108-116.