

黄瓜新杆菌漆酶的特征及在工业染料脱色中的应用

徐开凤, 霍滢, 郑穗平*

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

摘要: 漆酶具有染料脱色、织物表面改性和纺织品漂白的能力, 因此在纺织工业中有着广泛的用途。筛选一种具有碱稳定性且适合纺织染料脱色应用的漆酶具有挑战性。该研究从黄瓜新杆菌 (*Neobacillus cucumis*) 中获得了一种新型碱性漆酶 LacNC, 并在大肠杆菌中进行了表达。LacNC 是一种单体蛋白, 其分子量大小为 58 ku。LacNC 以 2,6-二甲氧基苯酚、丁香醛连氮 (SGZ) 和愈创木酚分别作为底物, 其最适 pH 值分别为 6.0、7.0 和 8.0。以愈创木酚为底物, LacNC 最适温度为 55 °C。LacNC 在 pH 值 5.0~11.0 范围内保持 85% 以上活性。在 40 °C 孵育 1 h 后, 保持 80% 以上活性。此外, LacNC 对靛蓝胭脂红和孔雀石绿处理 3 h, 脱色率分别为 90% 和 80% 以上, 对活性黑 B 的脱色率在 24 h 可达 85%。综上所述, 该研究获得了一种新型碱性漆酶, 在碱性条件下对合成染料展现出较高的脱色效率, 表明该漆酶是用于纺织工业废水处理的环保候选者。

关键词: 基因挖掘; 碱性漆酶; 碱稳定性; 纺织工业; 染料脱色

文章编号: 1673-9078(2025)03-107-114

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.3.0102

Characterization of Laccase from *Neobacillus cucumis* and Its Application in Industrial Dye Decolorization

XU Kaifeng, HUO Ying, ZHENG Suiping*

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Laccase is widely used in the textile industry for dye decolorization, fabric surface modification, and textile bleaching. Screening for a laccase that is alkaline stable and suitable for textile dye decolorization is challenging. A novel alkaline laccase (LacNC) was obtained from *Neobacillus cucumis* and expressed in *Escherichia coli*. LacNC is a monomeric protein with a molecular weight of 58 ku. The optimum pH values for LacNC were 6.0, 7.0, and 8.0 when 2,6-dimethoxyphenol, syringaldazine (SGZ), and guaiacol, respectively, were used as substrates. The optimal temperature for LacNC was 55 °C for the guaiacol substrate. The activity of LacNC remained more than 85% in the pH range of 5.0~11.0. After incubation at 40 °C for 1 h, the activity of LacNC was still higher than 80%. In addition, the decolorization rates of indigo carmine and malachite green by LacNC were more than 90% and 80% in 3 h, respectively, and the decolorization rate of reactive black B by LacNC reached 85% in 24 h. In this study, a new alkaline laccase demonstrating high decolorization

引文格式:

徐开凤, 霍滢, 郑穗平. 黄瓜新杆菌漆酶的特征及在工业染料脱色中的应用[J]. 现代食品科技, 2025, 41(3): 107-114.

XU Kaifeng, HUO Ying, ZHENG Suiping. Characterization of laccase from *Neobacillus cucumis* and its application in industrial dye decolorization [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(3): 107-114.

收稿日期: 2024-01-22

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2021YFC2104001)

作者简介: 徐开凤 (1998-), 女, 硕士, 研究方向: 酶工程, E-mail: kfxu0312@163.com

通讯作者: 郑穗平 (1972-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 发酵工程, 生物化工, 微生物学, 生化与分子生物学, 酶工程, E-mail: spzheng@scut.edu.cn

efficiency for synthetic dyes under alkaline conditions was obtained. Hence, this laccase is an environmentally friendly candidate for treating wastewater in the textile industry.

Key words: gene mining; alkaline laccase; alkali stability; textile industry; dye decolorization

漆酶 (EC 1.10.3.2) 属于多铜氧化酶家族, 通常含有四个铜离子, 四个铜离子形成三个结构域 T1、T2 和 T3^[1]。漆酶因能够氧化多种酚类和非酚类芳香族化合物, 在反应过程中仅产生水作为唯一副产物, 这种特性使其被称为绿色催化剂^[2,3]。

漆酶主要来源于真菌、细菌、植物和动物^[4-8], 来源于真菌的漆酶适用于酸性且低离子浓度的环境, 这限制了真菌漆酶的实际应用^[9]。细菌漆酶能够耐受碱性高温环境, 耐受高浓度氯化物和金属离子, 这些特性利于细菌漆酶用于碱性、高温和高离子浓度的工业应用^[10,11], 且细菌漆酶更易于在大肠杆菌中表达^[12]。当前被报道的细菌漆酶主要来源于嗜热细菌 (*Thermus thermophilus* HB27)、芽孢杆菌 (*Bacillus*)、假单胞菌 (*Pseudomonas*) 和链霉菌 (*Streptomyces*)^[13-15]。

漆酶因具有广泛的底物范围, 使其被广泛用于各种工业和生物技术应用, 例如在纺织工业中处理废水染料脱色^[16]、造纸工业中进行生物漂白、作为检测酚类污染物的生物传感器、降解生物质资源中的木质素等^[17]。目前, 偶氮染料、蒽醌染料以及三苯甲烷等染料被广泛用于纺织、皮革、塑料、化妆品和食品加工工业^[18,19]。纺织染料废水 pH 值为碱性, 含有高浓度的金属离子和氯化物^[20]。由于这一特性, 对具有良好碱稳定性的漆酶提出了广泛的需求。因此, 研究人员将目光投向了获得能够适用于纺织废水染料脱色处理的碱性漆酶。来源于 *Thermus thermophilus* 的漆酶 LacTT 最适 pH 值是 6.0, 能够一定程度上降解合成染料^[21]。来源于地衣芽孢杆菌的漆酶 rLAC 在添加介质的条件下对结构不同的染料进行脱色, 脱色率为 50%~100% 不等^[22]。然而, 目前能够在碱性且高浓度金属离子等恶劣条件下具有高酶活的漆酶数量有限, 难以满足纺织工业对漆酶的需求。因此, 通过基因挖掘策略获得适用于碱性条件的漆酶, 并将其应用于纺织染料的脱色过程, 有望为解决这一问题提供有效途径。

该研究通过基因挖掘的策略, 从黄瓜新杆菌 (*Neobacillus cucumis*) 中获得了一个碱性漆酶基因

LacNC, 在大肠杆菌中克隆表达, 对 LacNC 进行了纯化和生化性质研究。此外还将 LacNC 对合成染料的脱色降解进行了初步的探究, 证明漆酶 LacNC 被应用于纺织染料脱色的可行性。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒

大肠杆菌 Top10 用于基因克隆宿主菌株, 大肠杆菌 BL21 (DE3) 用于蛋白表达菌株。以 pET-28a 为载体, 编码漆酶 LacNC (GenBank: MBI0579807.1) 的基因是从 NCBI 数据库中获取, 委托苏州金唯智科技有限公司合成。

1.2 化学品和试剂

愈创木酚, ABTS 购自美国 Sigma 公司; 丁香醛连氮 (SGZ)、2,6-DMP、活性黑 B、靛蓝胭脂红、孔雀石绿购自中国阿拉丁公司。该研究所用其它化学试剂均为分析纯试剂。

1.3 试验方法

1.3.1 基因挖掘与序列分析

来自 *Caldalkalibacillus thermarum* TA2. A1 的碱性漆酶 CtLac (AVD69558.1) 为探针序列, 在 NCBI 数据库中进行 blastp, 保留氨基酸相似性为 45%~80% 的序列, 用 MAFFT 对齐序列, 根据最大似然法用 Fasttree 软件构建系统发育树, 用 CD-search 工具 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 预测保守结构域, 用 NovoPro (<https://www.novopro.cn/tools/signalp>) 预测信号肽。ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测蛋白分子量。用 Esprpt 网站 (<https://esprpt.ibcp.fr/ESPrpt/cgi-bin/ESPrpt.cgi>) 进行序列比对。

1.3.2 漆酶的表达与纯化

将重组表达菌株接种到 10 mL 的 LB 液体培养基中, 37 °C, 200 r/min 震荡过夜培养。将过夜培养菌液按 1:100 接种到 TB 液体培养基中, 37 °C, 220 r/min 震荡培养至 OD₆₀₀ 达到 0.6, 加入终浓

度 0.1 mmol/L 的诱导剂 IPTG, 16 °C, 180 r/min 过夜诱导表达。发酵结束后将培养液离心收集菌体 (6 000 r/min, 5 min), 并用 50 mL 结合缓冲液重悬菌体, 同时加入终浓度为 0.4 mmol/L CuSO₄。超声破碎菌体 (超声 3 s, 间隔 3 s, 40 min)。于 10 000 r/min 离心 30 min。取上清液利用层析仪做亲和层析纯化。用 pH 值 8.0 的结合缓冲液 (500 mmol/L 的 NaCl, 20 mmol/L 的 Tris-HCl) 进行纯化, 用 pH 值 8.0 的洗脱缓冲液 (500 mmol/L 的 NaCl, 20 mmol/L 的 Tris-HCl, 300 mmol/L 的咪唑) 进行梯度洗脱。收集含有漆酶的馏分, 并用 50 mmol/L 的磷酸钠缓冲液进行脱盐去除酶组分中高浓度的咪唑和氯化钠。

1.3.3 LacNC 蛋白浓度和酶活测定

用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 对纯化的 LacNC 进行估计。纯化后的蛋白浓度以牛血清白蛋白 (BSA) 为标准品, 采用 Bradford 法测定。在含有 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液中, 添加终浓度为 100 μmol/L 的 CuSO₄ 溶液, 以愈创木酚为底物测定漆酶活性。反应时间 5 min, 反应结束放置冰上 30 s 终止反应。漆酶活性的单位定义为每分钟氧化 1 μmol 底物所需的酶量。愈创木酚的氧化在 465 nm ($\epsilon=12\ 100\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$) 进行检测。

1.3.4 LacNC 酶学性质测定

1.3.4.1 最适温度

在 pH 值 8.0 的条件下, 测定 LacNC 在 30~70 °C 范围内的活性, 研究其最适温度。

1.3.4.2 最适 pH 值

在最适温度条件下, 控制 pH 值 3.0~11.0 范围内测定 LacNC 的活性, 确定其最佳 pH 值。采用 50 mmol/L 柠檬酸缓冲液 (pH 值 3.0~6.0)、50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 值 6.0~9.0) 和 50 mmol/L 甘氨酸氢氧化钠缓冲液 (pH 值 9.0~11.0)。

1.3.4.3 温度稳定性

为了确定 LacNC 的热稳定性, 在最适 pH 值条件下, 酶在 40 °C 和 50 °C 下预孵育 10~60 min, 然后测定剩余酶的活性。

1.3.4.4 pH 值稳定性

为了确定 LacNC 的 pH 值稳定性, 将纯化的酶在 4 °C, pH 值 5.0~11.0 范围孵育 24 h, 测定 LacNC 的残留活性。采用 50 mmol/L 柠檬酸缓冲液 (pH 值 5.0~6.0)、50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH

值 6.0~9.0) 和 50 mmol/L 甘氨酸氢氧化钠缓冲液 (pH 值 9.0~11.0)。

1.3.4.5 金属离子和不同铜离子浓度对酶活的影响

在 Tris-HCl 缓冲液中加入 0.1 mmol/L 浓度的不同氯化物金属离子 (Li⁺, Mn²⁺, Co²⁺, K⁺, Ca²⁺, Na⁺, Mg²⁺, Zn²⁺), 以评估不同金属离子对 LacNC 酶活的影响。在 Tris-HCl 缓冲液中加入 0~100 mmol/L 的硫酸铜, 以评估 Cu²⁺ 对 LacNC 酶活性的影响。

1.3.5 LacNC 降解不同合成染料

采用活性黑 B (RBB, $\lambda_{\text{max}}=595\ \text{nm}$)、靛蓝胭脂红 ($\lambda_{\text{max}}=612\ \text{nm}$) 和孔雀石绿 ($\lambda_{\text{max}}=620\ \text{nm}$) 来验证 LacNC 对合成染料的脱色效果。脱色体系 2 mL, 包括 100 μmol/L 的 CuSO₄, 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 值 8.0)、50 mg/L 的染料和 40 U/L 纯化的 LacNC, 在 40 °C 下脱色反应 24 h。在每种染料的最大吸收波长下测定其分光光度值。

1.3.6 数据分析

所有实验均设计三个平行, 利用 Microsoft Excel 2010 处理实验数据, 利用 Origin 计算平均值和标准差并绘图, 以误差线表示标准偏差。

2 结果与讨论

2.1 基因挖掘与序列分析

来自极端环境 *Caldalkalibacillus thermanum* TA2. A1 的碱性漆酶 CtLac 具有较强的碱稳定性, 为了获得一种新型碱性漆酶, 选取 CtLac 为作为探针序列, 选取与探针酶氨基酸序列相似为 45%~80% 的 859 条序列, 构建系统发育树。结果表明, 这些序列可分为不同的系统发育分支。探针酶 CtLac 位于红色分支簇, 选取了一个未被报道的候选序列命名为 LacNC (GenBank : MBI0579807.1), LacNC 来自黄瓜新杆菌 (*Neobacillus cucumis*), 并且位于红色分支簇 (图 1a), 与 CtLac 同源性为 48.50%。LacNC 理论分子量为 56.7 ku, 含有 479 个氨基酸, 预测的信号肽为 N 端 15 个氨基酸。通过与当前已被报道的细菌漆酶进行序列比对, 发现 LacNC 具有漆酶典型的四个保守结构域 L1~L4 (图 1b), 说明 LacNC 理论上具有漆酶活性。

2.2 候选漆酶的表达与纯化

候选漆酶基因 LacNC 委托苏州金唯智生物科技有限公司进行基因合成并连接到质粒 pET-28a。将

重组质粒转入大肠杆菌 BL21 (DE3), 37 °C 培养 1.5~2 h, 在 16 °C 诱导表达 12 h 后, 对蛋白进行纯化。LacNC 能够在大肠杆菌中异源表达并成功纯化, SDS-PAGE 显示 LacNC 蛋白大小为 58 ku (图 2a),

比理论分子量稍大。实验结果表明, LacNC 能将愈创木酚氧化为棕红色, 具有明显的漆酶活性 (图 2b), 最高酶活为 0.41 U/mg。因此, 对 LacNC 做进一步酶学性质探究。

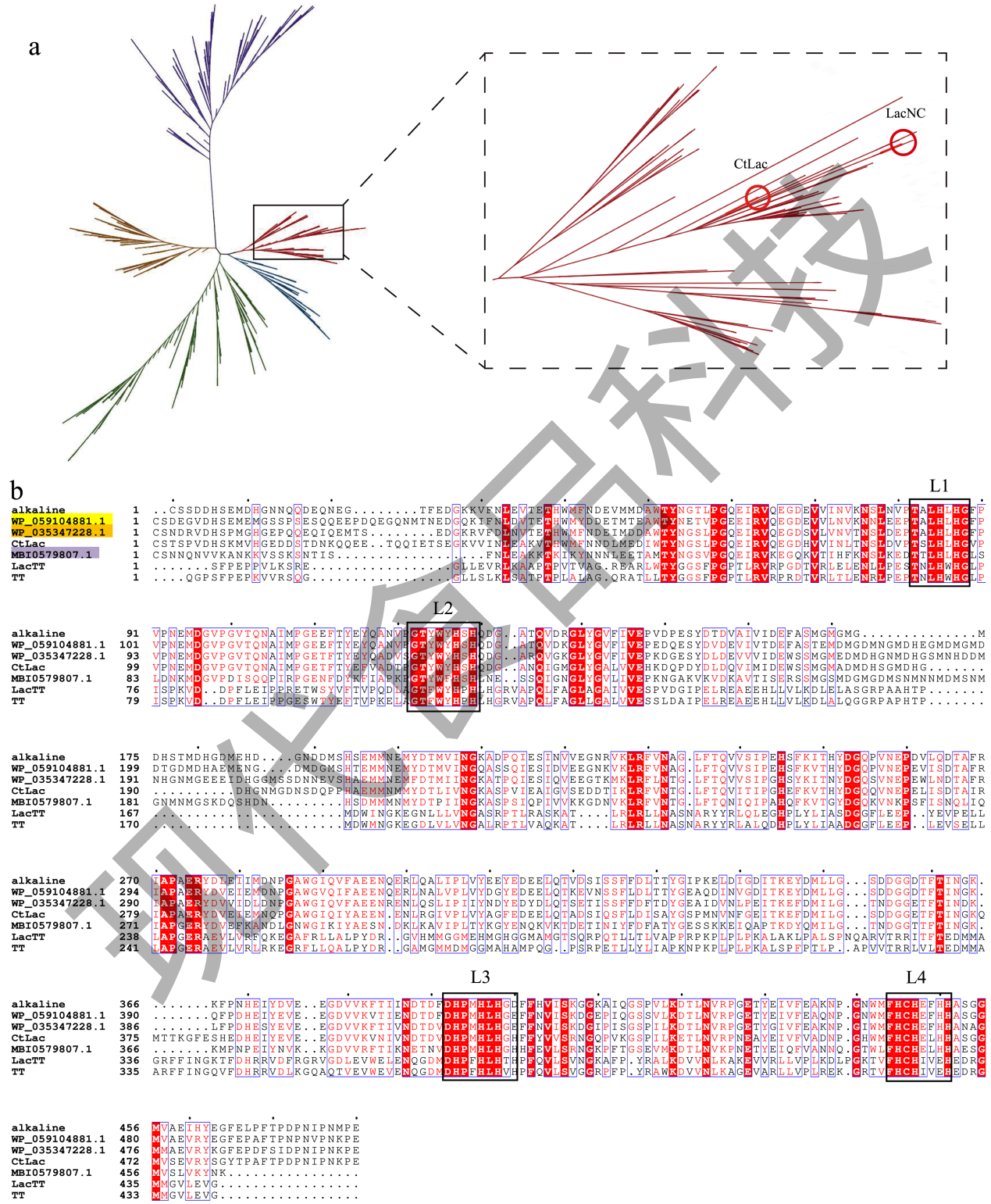


图 1 新型漆酶的基因挖掘

Fig.1 Genetic mining of novel laccase

注: (a) 以 CtLac 为探针的漆酶系统进化分析; (b) LacNC 的序列比对分析。

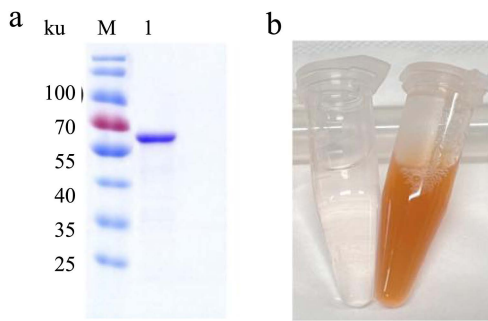


图2 漆酶的纯化与酶活反应

Fig.2 Purification and enzyme activation reactions of laccase

注: (a) 漆酶的 SDS-PAGE 分析, M 为蛋白 Marker, 1 为纯化后的 LacNC 蛋白; (b) 漆酶与愈创木酚反应前后对比。

2.3 LacNC的酶学性质

2.3.1 最适pH值

在 50 mmol/L 的 pH 值 3.0~11.0 缓冲液中, 以 2,6-DMP、SGZ 和愈创木酚为底物, LacNC 的最适 pH 值分别是 6.0、7.0 和 8.0(图3)。随着 pH 值的升高, LacNC 的相对酶活性呈现先上升后下降的趋势, 这种变化趋势突显了 LacNC 在不同 pH 条件下的酶活性特点。据报道, 来自链霉菌的漆酶通常表现为碱性酶, 其最适 pH 值介于 9.0~10.0^[23]; 相比之下, 来自卡式嗜热嗜碱杆菌的漆酶最适 pH 值为 8.0^[24], 而来自地衣芽孢杆菌的漆酶最适 pH 值为 7.0~8.0^[25]。与这些不同来源漆酶比较, LacNC 在 pH 值为 7.0~8.0 的范围内展现出较高的酶活性, 这表明它是一种典型的碱性漆酶。相比于其它漆酶, LacNC 似乎对氧化酚类化合物的特异性更强, 可能是由于酶的底物结合位点的结构差异^[26]。LacNC 不能氧化 ABTS, 可能是由于 ABTS 的非酚性质。此外, 漆酶具有广泛的底物特异性, 并且氧化的目标底物根据漆酶的来源和结构不同^[27]。

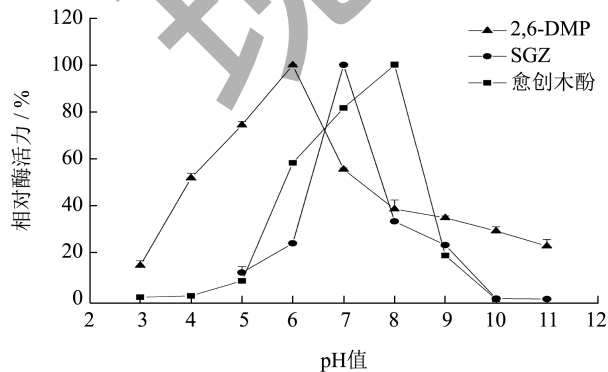


图3 pH 值对酶活性的影响

Fig.3 Effect of pH on enzyme activity

2.3.2 最适温度

在最适 pH 值条件下, 以愈创木酚为底物, 在 30~70 °C 温度范围内测定 LacNC 的最适温度, 将最高酶活定义为 100%, LacNC 的最适温度是 55 °C (图4)。根据已有文献报道, 目前已经有一些碱性漆酶被发现, 然而大多数碱性漆酶的最适工作温度范围通常在 30~40 °C^[8]。与这些漆酶相比, LacNC 在 50~55 °C 范围内展现出超过 85% 的酶活性, 这表明 LacNC 在高温条件下仍然保持高活性。这一特性使得 LacNC 在碱性中温环境中具有优越的应用潜力, 而这正是许多工业应用环境所需要的。

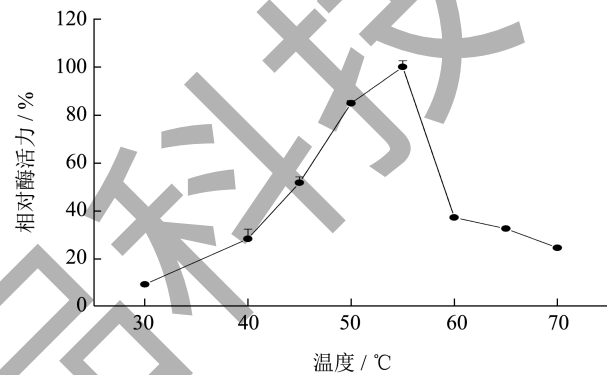


图4 温度对酶活性的影响

Fig.4 Effect of temperature on enzyme activity

2.3.3 热稳定性

为了确定 LacNC 的热稳定性, 分别在 40 °C 和 50 °C 下孵育 10~60 min 后, 在最佳条件下测定 LacNC 的残留酶活。以未孵育的酶活定义为 100%。如图5所示, LacNC 在 40 °C 处理 1 h 后, 保持 80% 以上活性; 在 50 °C 处理 1 h 后, 残留活性为 50% 以上。说明 LacNC 在 40 °C 条件下具有较高的稳定性, 可以在 40 °C 条件下进行时间较长的催化反应, 而在 50 °C 条件下可用于时间相对较短的催化反应。

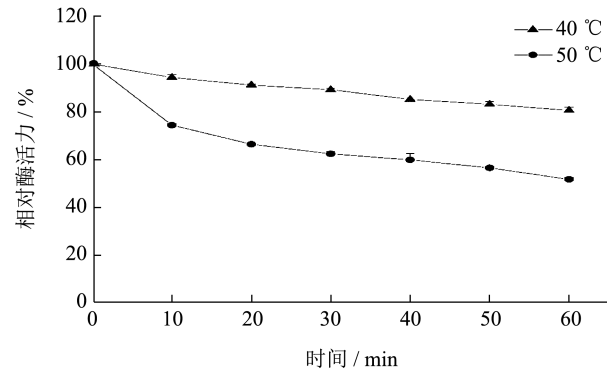


图5 重组漆酶温度稳定性

Fig.5 The temperature stability of recombinant laccase

2.3.4 pH值稳定性

为了确定 LacNC 的 pH 值稳定性, 在 pH 值 5.0~11.0 下孵育 24 h 后, 在最佳条件下测定 LacNC 的残留酶活。将最高的酶活定义为 100%。如图 6 所示, LacNC 在酸性条件下能维持超过 85% 以上的相对活性。在 pH 值 8.0~11.0 能保留 90% 以上活性, 这意味着 LacNC 可以在较宽的 pH 值范围内保持稳定, 并且具有显著的碱稳定性。碱稳定性是漆酶在工业应用中的重要考虑因素之一, Liu 等^[28]通过 MD 模拟解析了紫薇细菌漆酶的碱性稳定机理, 他们推测在酸性 pH 条件下形成的不规则的结构可能有利于漆酶 BpLac 的催化活性, 但同时可能对结构稳定性不利。相反, 在碱性 pH 条件下形成的刚性 α 螺旋和 β 片段可能有助于 BpLac 的碱稳定性, 但可能会阻碍底物的氧化反应。然而, 与 BpLac 相比, LacNC 在酸性和碱性条件下都表现出较好的稳定性。尽管目前我们对 LacNC 这种良好的碱稳定性机理尚不清楚, 但这种双重稳定性使得 LacNC 能够在不同环境条件下保持高效的酶活性, 展现出了作为一种优越酶类催化剂的独特优势, 值得进一步深入研究和工业应用。

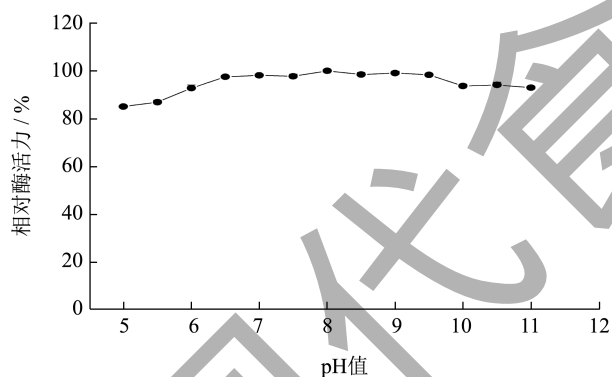


图 6 重组漆酶 pH 值稳定性

Fig.6 The pH stability of recombinant laccase

2.3.5 金属离子及铜离子对酶活的影响

Cu^{2+} 是漆酶的重要辅助因子, 研究了不同浓度的 Cu^{2+} (0~100 mmol/L) 对漆酶酶活的影响。当添加的 Cu^{2+} 终浓度为 10 mmol/L 时, LacNC 达到最高酶活, Cu^{2+} 浓度超过 10 mmol/L 时, 酶活开始下降 (见图 7a)。纺织废水中存在大量的氯化物金属离子, 将 50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的不同氯化物金属离子 (Li^+ 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+}) 添加到 Tris-HCl 缓冲液中, 评估金属离子对 LacNC 的酶活性影响, 结果表明, 常见的金属离子对 LacNC 活性的抑制作用不明显, K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 离子抑制了

10% 的活性。在 Li^+ 、 Na^+ 、 Mn^{2+} 离子存在的条件下, LacNC 残留 80% 以上活性。其中 Zn^{2+} 对 LacNC 酶活抑制作用最大, 仅保留 10% 以下的活性 (图 7b)。因此, 在应用 LacNC 时, 应避免 Zn^{2+} 的存在。

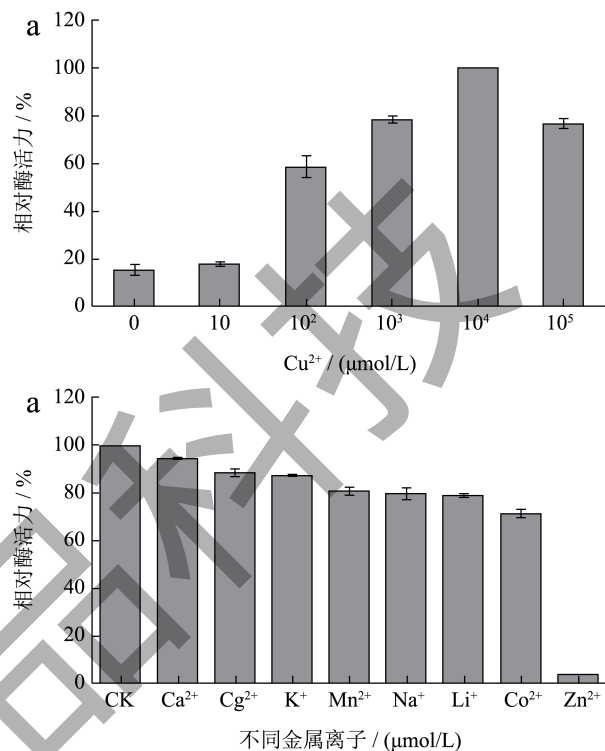


图 7 金属离子对酶活的影响

Fig.7 Effect of metal ions on enzyme activity

2.4 合成染料的脱色研究

为了研究 LacNC 对合成染料的脱色作用, 在 40 $^{\circ}\text{C}$, pH 值 8.0 下评价 LacNC 对活性黑 B、靛蓝胭脂红和孔雀石绿的脱色能力。LacNC 对三种染料的脱色效果有所差异, 对靛蓝胭脂红和孔雀石绿处理 3 h 后, 脱色率可分别达到 90%、80% 以上; 对于活性黑 B 的脱色率在处理 6 h 后, 可达到 80% (图 8)。根据文献报道, 来自地衣芽孢杆菌的漆酶 (rLAC) 对合成染料的脱色率低于 27%, 添加乙酰丁香酮、ABTS 和丁醛等介质时, 其脱色率可提高至 50%~100%^[22]。Zhang 等^[29]仅使用来自 *Bacillus vallismortis* fmb-103 孢子漆酶脱色 24 h, 对于孔雀石绿的脱色效率不超过 15%, 添加 ABTS 介质后其脱色效率也仅能达到 77.84%。漆酶 silA 在室温下对孔雀石绿脱色 3 h 后, 脱色率可达到 80%^[30]。由此可见, LacNC 在不添加任何介质的情况下, 具有较高的脱色效率, 说明 LacNC 在纺织染料脱色方面具有较大的应用潜力。

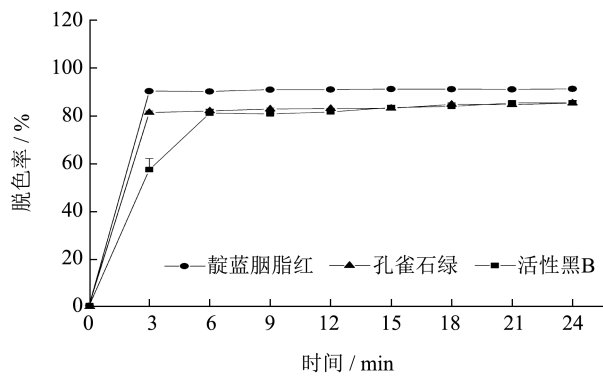


图 8 LacNC 对合成染料的脱色作用

Fig.8 Decolorization of synthetic dyes by LacNC

3 结论

该研究在大肠杆菌中鉴定并异源表达了一种来自黄瓜新杆菌 (*Neobacillus cucumi*) 的碱性漆酶 LacNC。LacNC 以愈创木酚为底物, 在 55 °C 和 pH 值为 8.0 的条件下表现出最佳活性, 并在 pH 值为 5.0~11.0 的范围内保持 85% 以上活性, 具有较好的碱稳定性。此外, LacNC 也具有较强的金属离子耐受性。LacNC 在无需添加介质的条件下, 对靛蓝胭脂红和孔雀石绿处理 3 h 后, 脱色率分别为 90%、80% 以上, 对活性黑 B 处理 6 h 后, 脱色率可达到 80% 以上。总之, 该研究介绍了一种适用于碱性中温工业环境的新型漆酶 LacNC, 在纺织废水脱色方面展现出显著的应用潜力。

参考文献

- [1] MESSERSCHMIDT A, HUBER R. The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin. Modelling and structural relationships [J]. European Journal of Biochemistry, 1990, 187(2): 341-352.
- [2] GIARDINA P, FARACO V, PEZZELLA C, et al. Laccases: a never-ending story [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2010, 67(3): 369-385.
- [3] SINGH G, BHALLA A, KAUR P, et al. Laccase from prokaryotes: a new source for an old enzyme [J]. Reviews in Environmental Science and Bio-Technology, 2011, 10: 309-326.
- [4] WANG J, FENG J, JIA W, et al. Lignin engineering through laccase modification: a promising field for energy plant improvement [J]. Biotechnology for Biofuels, 2015, 8: 145.
- [5] HULLO M F, MOSZER I, DANCHIN A, et al. CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase [J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(18): 5426-5430.
- [6] MOUGIN C, JOLIVALT C, BRIOZZO P, et al. Fungal laccases: from structure-activity studies to environmental applications [J]. Environmental Chemistry Letters, 2003, 1(2): 145-148.
- [7] ARAKANE Y, MUTHUKRISHNAN S, BEEMAN R W, et al. Laccase 2 is the phenoloxidase gene required for beetle cuticle tanning [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(32): 11337-11342.
- [8] JANUSZ G, PAWLIK A, SWIDERSKA-BUREK U, et al. Laccase properties, physiological functions, and evolution [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(3): 966.
- [9] TORRES-SALAS P, MATE D M, GHAZI I, et al. Widening the pH activity profile of a fungal laccase by directed evolution [J]. ChemBiochem, 2013, 14(8): 934-937.
- [10] BRANDER S, MIKKELSEN J D, KEPP K P. Characterization of an alkali- and halide-resistant laccase expressed in e-coli : CotA from *Acillus clausii* [J]. Plos One, 2014, 9(6): e99402.
- [11] SHARMA P, GOEL R, CAPALASH N. Bacterial laccases [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2007, 23(6): 823-832.
- [12] BRISSOS V, PEREIRA L, MUNTEANU F-D, et al. Expression system of CotA-laccase for directed evolution and high-throughput screenings for the oxidation of high-redox potential dyes [J]. Biotechnology Journal, 2009, 4(4): 558-563.
- [13] VIRK A P, SHARMA P, CAPALASH N. Use of laccase in pulp and paper industry [J]. Biotechnology Progress, 2012, 28(1): 21-32.
- [14] SERRANO-POSADA H, VALDERRAMA B, STOJANOFF V, et al. Thermostable multicopper oxidase from *Thermus thermophilus* HB27: crystallization and preliminary x-ray diffraction analysis of apo and holo forms [J]. Acta Crystallographica Section F-Structural Biology Communications, 2011, 67(12): 1595-1598.
- [15] BELLO M, VALDERRAMA B, SERRANO-POSADA H, et al. Molecular dynamics of a thermostable multicopper oxidase from *Thermus thermophilus* HB27: structural differences between the apo and holo forms [J]. PLoS One, 2012, 7(7): e40700.
- [16] TELKE A A, GHODAKE G S, KALYANI D C, et al. Biochemical characteristics of a textile dye degrading extracellular laccase from a *Bacillus* sp. ADR [J]. Bioresource Technology, 2011, 102(2): 1752-1756.
- [17] KUDANGA T, LE ROES-HILL M. Laccase applications in biofuels production: current status and future prospects [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(15): 6525-6542.

- [18] HSU C-A, WEN T-N, SU Y-C, et al. Biological degradation of anthroquinone and azo dyes by a novel laccase from *Lentinus* sp [J]. Environmental Science Technology, 2012, 46(9): 5109-5117.
- [19] WONG K-S, HUANG Q, AU C-H, et al. Biodegradation of dyes and polyaromatic hydrocarbons by two allelic forms of *Lentinula edodes* laccase expressed from *Pichia pastoris* [J]. Bioresource Technology, 2012, 104: 157-164.
- [20] 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, 2013, 134: 81-86.
- [21] LIU H, CHENG Y, DU B, et al. Overexpression of a novel thermostable and chloride-tolerant laccase from *Thermus thermophilus* SG0.5JP17-16 in *Pichia pastoris* and its application in synthetic dye decolorization [J]. Plos One, 2015, 10(3): e0119833.
- [22] LI T, WANG H, LI J, et al. Enzymatic characterization, molecular dynamics simulation, and application of a novel *Bacillus licheniformis* laccase [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 167: 1393-1405.
- [23] FENG H, ZHANG D, SUN Y, et al. Expression and characterization of a recombinant laccase with alkalistable and thermostable properties from *Streptomyces griseorubens* JSD-1 [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015, 176(2): 547-562.
- [24] GHATGE S, YANG Y, SONG W-Y, et al. A novel laccase from thermoalkaliphilic bacterium *Caldalkalibacillus thermanum* strain TA2.A1 able to catalyze dimerization of a lignin model compound [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(9): 4075-4086.
- [25] LU L, ZHAO M, WANG T-N, et al. Characterization and dye decolorization ability of an alkaline resistant and organic solvents tolerant laccase from *Bacillus licheniformis* LS04 [J]. Bioresource Technology, 2012, 115: 35-40.
- [26] XU F, SHIN W, BROWN S H, et al. A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1996, 1292(2): 303-311.
- [27] MAJUMDAR S, LUKK T, SOLBIATI J O, et al. Roles of small laccases from streptomycetes in lignin degradation [J]. Biochemistry, 2014, 53(24): 4047-4058.
- [28] LIU J, LI B, LI Z, et al. Deciphering the alkaline stable mechanism of bacterial laccase from *Bacillus pumilus* by molecular dynamics simulation can improve the decolorization of textile dyes [J]. Journal of Hazardous Materials, 2023, 443: 130370.
- [29] ZHANG C, DIAO H, LU F, et al. Degradation of triphenylmethane dyes using a temperature and pH stable spore laccase from a novel strain of *Bacillus vallismortis* [J]. Bioresource Technology, 2012, 126: 80-86.
- [30] CORIA-ORIUNDO L L, BATTAGLINI F, WIRTH S A. Efficient decolorization of recalcitrant dyes at neutral/alkaline pH by a new bacterial laccase-mediator system [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2021, 217: 112237.