重组短小芽孢杆菌 CotA 漆酶的酶学性质及发酵优化研究

许开忠[1,2]，王雅静[1,2]，马 慧[1,2]，蔡宇杰[1,2]，廖祥儒[1,2]，管政兵[*1,2]
（1. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122）

摘要：细菌漆酶具有良好的热稳定性和抗碱性环境能力，在工业废水处理和染料脱色方面具有很大的潜力。通过研究短小芽孢杆菌 W3 菌株的 CotA 漆酶基因在大肠杆菌中重组表达的酶学性质，对其发酵培养基进行优化，以提高产量。利用分子手段实现 CotA 漆酶基因在大肠杆菌中的重组表达，并利用 BP 神经网络建模和萤火虫算法寻优对 CotA 漆酶发酵培养基进行优化，最后重组表达的 CotA 漆酶进行染料脱色研究。结果表明，重组菌株表达的 CotA 漆酶具有良好的热稳定性和耐碱能力，最适反应 pH 值为 3.5，最适反应温度为 80 ℃。重组 CotA 漆酶对底物 ABTS 具有良好的亲和能力，K_m 为 0.247 mmol/L，K_{cat} 为 41.32 s^{-1}。在适宜条件下的重组 CotA 漆酶的表达量为 1 915.3 U/L，使用 BP 神经网络和萤火虫算法优化培养基获得最佳的发酵培养基配方为：蛋白胨 1.16 g/dL、酵母粉 0.428 g/dL、NaCl 1.06 g/dL、$CuSO_4$ 0.274 mol/L 和甘油（体积分数）0.931%。优化过的培养基产 CotA 漆酶酶活为 3 088.68 U/L，相比未优化之前提高了 61.26%。重组表达的 CotA 漆酶对孔雀石绿和酸性蓝 129 脱色效果明显，达到 90%脱色率。短小芽孢杆菌 W3 来源的 CotA 漆酶具有良好的酶学性质和工业应用前景。利用 BP 神经网络偶联萤火虫算法寻优是 CotA 漆酶发酵培养基优化的有效手段。

关键词：短小芽孢杆菌，CotA 漆酶，BP 神经网络，萤火虫算法，染料脱色
中图分类号：Q815　**文章编号**：1673-1689(2020)12-0028-07　**DOI**：10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.12.005

Fermentation Optimization and Enzymatic Properties of Recombinant CotA Laccase from *Bacillus pumilus*

XU Kaizhong[1,2], *WANG Yajing*[1,2], *MA Hui*[1,2], *CAI Yujie*[1,2], *LIAO Xiangru*[1,2], *GUAN Zhengbing*[*1,2]
(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The CotA-laccase with good thermal stability and resistance to alkaline environments is known as a green catalyst and widely used in industrial dye degradation and wastewater treatment. The enzymatic properties of CotA-laccase cloned from *Bacillus pumilus* W3 expressed in *E. coli* was studied. Its yield was increased through optimizing fermentation medium. The recombinant

收稿日期：2019-05-28
基金项目：国家自然科学基金项目(31472003)；江苏高校优势学科建设工程资助项目；111 引智计划项目(111-2-06)；江苏省现代发酵工业协同创新中心项目。
* **通信作者**：管政兵(1981—)，男，博士，副教授，硕士研究生导师，主要从事基因工程、酶工程、代谢工程等研究。
E-mail：guanzb525@163.com

expression of CotA laccase gene in *E. coli* was achieved by molecular means. The CotA-laccase fermentation medium was optimized by BP neural network and firefly algorithms, and the dye decolorization of recombined CotA-laccase was investigated. The recombinant CotA-laccase had good thermal stability and alkali tolerance. The optimal condition was pH 3.5 and 80 ℃. Recombinant CotA laccase showed goodaffinity for ABTS with a K_m of 0.247 mmol/L and a K_{cat} of 41.32 s^{-1}. The expression of recombinant CotA laccase was 1915.3 U/L under suitable conditions. The compositions of fermentation medium optimized by BP neural network and firefly algorithms were 1.16% of peptone, 0.428% of yeast powder, 1.06% of NaCl, 0.274 mol/L of $CuSO_4$ and 0.931% of glycerol. The CotA-laccase activity of the optimized medium reached 3 088.68 U/L, which was 61.26% higher than that before optimization. The significant decolorization effect of recombinant CotA laccase on malachite green and acid blue 129 was observed, reaching 90%decolorization rate. CotA-laccase cloned from *Bacillus pumilus* W3 has good enzymatic properties, showing promising industrial application prospects.The BP neural network modeling combined with firefly algorithm is a feasible methodto optimize the *E. coli* fermentation.

Keywords: *Bacillus pumilus*, CotA-laccase, BP neural network, firefly algorithm, dye decolorization

漆酶(EC 1.10.3.2)是一种多铜氧化酶,因其能够催化多种酚类、芳香族有机物氧化,并且以氧原子为最终电子受体,最终生成水,并且没有其他有害的副产物生成[1],被称为一种绿色、环保、环境友好的生物催化剂。漆酶在印染废水的处理、药物合成、食品能源等领域具有广泛的应用前景。其中细菌漆酶又因其具有更宽广的底物范围和热稳定性,能够耐受碱性环境等特点,可以适用于工业染料废水的处理。

目前已有报道表明,许多细菌漆酶被筛选出来并克隆表达,如 2015 年 Liu 等从嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*)中克隆了漆酶基因 *LacTT*,再应用于工业染料刚果红和活性黑的脱色降解[2]。2018 年,Gaur 和 Nisha 等分离并克隆了新型肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)漆酶 *lac* 用于从大米和小麦麸生物质生产乙醇[3]。作者以所在实验室从五倍子原蜜中筛选出的短小芽孢杆菌 W3(*Bacillus pumilus* W3)中分离的 CotA 漆酶基因(GenBank:AGO57931.1)为出发点,通过分子克隆的手段,将其克隆到具有信号肽的 pet-22b 质粒上,并在大肠杆菌中得到了表达。在适宜的发酵环境下,重组 CotA 漆酶的表达量为 1 915.3 U/L。想要提高 CotA 漆酶的表达量,优化发酵培养基无疑是最直接有效的方法。

传统的微生物培养基优化方法主要用正交设计、响应面等方法。然后微生物发酵是一个多因素影响、非线性的黑箱系统,如果用传统的优化方法不仅工作量大而且难以准确地预测。而 BP 神经网络模型(Back propagation neural network)是一种按照误差逆向传播来达到训练效果的多层前馈神经网络[4]。使用神经网络建模无须事先知道输入与输出之间的数学关系,而且通过自身的训练,学习某种规则来达到最接近期望输出值的结果。其核心思想是利用梯度下降的搜索方法来达到网络实际输出和期望的误差均方差最小。因此 BP 神经网络在拟合非线性关系上具有良好的适应性,适合于多变量多因素的过程建模。该建模方式已经被广泛地应用到生物发酵领域。

萤火虫算法(Firefly algorithm)是一种来源于萤火虫的闪烁行为的仿生群智能优化算法[5]。该算法模拟萤火虫在空间移动时,发光弱的萤火虫会被发光强的萤火虫吸引的这一特点建立的数学模型。在搜索过程中,所有萤火虫互相吸引,吸引能力只跟发光强度和距离相关,当亮度一样时则做随机运动,最终发光最亮的萤火虫就是函数的最优解。

本研究中首次组合运用 BP 神经网络和萤火虫算法对重组大肠杆菌发酵产 CotA 漆酶培养基进行优化,运用 16 组实验数据作为样本数据进行神经网络的训练和拟合,完成优化任务。

1 材料与方法

1.1 菌种和质粒载体

短小芽孢杆菌 W3:作者所在实验室保存;克隆和表达载体 pET-22b:购自 TaKaRa(大连)公司;大肠杆菌 JM109 和 BL21(DE3):购自 TransGen(北京)公司。

1.2 主要试剂和仪器

高保真酶 PrimeSTAR、限制性内切酶、氨苄青霉素(Amp)、异丙基硫代半乳糖苷(IPTG):购自 TaKaRa(大连)公司;2′-联氨-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS):购自 Sigma-Aldrich(中国上海)公司;本实验中所用的化学试剂全部为分析纯。

梯度 PCR 仪:杭州博日科技有限公司产品;凝胶核酸电泳仪:北京六一仪器厂制造;高速冷冻离心机:湖南湘仪实验室仪器开发有限公司产品;恒温水浴锅:常州中诚仪器制造有限公司产品;组合式摇床:太仓市强乐实验设备有限公司产品;UV-6000 紫外可见分光光度计:上海元析仪器有限公司产品;全自动蛋白电泳仪:生工生物工程(上海)股份有限公司产品。

1.3 培养基

LB 液体培养基:蛋白胨 1 g/dL,酵母粉 0.5 g/dL,NaCl 1 g/dL;pH 7.0。固体培养基添加 2~3 g/dL 的琼脂。

发酵培养基:蛋白胨 0.6~1.2 g/dL,酵母粉 0.3~0.6 g/dL,NaCl 0.6~1.2 g/dL,$CuSO_4$ 0.15~0.30 mmol/L,甘油 0.6%~1.2%(体积分数)。

所有培养基都经过 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

1.4 实验方法

1.4.1 CotA 漆酶基因的克隆表达 根据 W3 全基因组信息设计引物,上游引物为:5′-CCGGAATTCGATGAACCTAGAAAAATTTG-3′,下游引物为:5′-CCCAAGCTTGTACTGGATGATATCCATCGGCC-3′,酶切位点用下划线表示(*EcoR* Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ)。提取短小芽孢杆菌 W3 的全基因组作为模板,使用高保真酶 PrimeSTAR 进行 PCR 扩增目的条带。PCR 体系:PrimeSTAR 缓冲液 10 μL,dNTPs 4 μL,上游引物 1 μL,下游引物 1 μL,模板 1 μL,DNA 聚合酶 0.5 μL,双蒸无菌水 32.5 μL。扩增条件为:95 ℃ 预变性 10 s;57 ℃退火 10 s;72 ℃延伸 90 s;循环 20 次。对 PCR 产物和质粒进行双酶切并产物回收,使用 T4 连接酶于 16 ℃连接 4 h,然后转化大肠杆菌 JM109,挑取阳性克隆进行测序验证。对于测序验证正确的质粒,转入大肠杆菌 BL21(DE3)进行表达。

1.4.2 重组菌株的诱导表达及蛋白质纯化 诱导方法:接种体积分数 1%的新鲜菌液到 50 mL 的发酵培养基。37 ℃、200 r/min 条件下培养到 OD_{600}=0.3~0.6。将 IPTG(0.4 mmol/L)加到培养基中,然后在25 ℃、200 r/min 条件下继续培养 8 h 进行粗酶制备。

粗酶制备:4 ℃、5 000 *g* 离心 15 min 然后收获菌体。使用 pH 7.0 的 Na_2HPO_4-NaH_2PO_4 缓冲液洗涤菌体。加入等体积 pH 7.0 的渗透压缓冲液(20 mmol/L 的 Na_2HPO_4-NaH_2PO_4,36%(体积分数)蔗糖,2.5 mmol/L EDTA),然后在 25 ℃下,充分搅拌 20 min。马上加入 5 倍体积的预冷超纯水,引发渗透压冲击[6],平衡后离心收集上清液。

蛋白质纯化方法:使用 HisTrap HP 纯化 CotA 漆酶,采用高浓度咪唑线性洗脱的方法获得 CotA 漆酶纯化蛋白质。并用 HiTrap™ 进行脱盐处理。并通过 SDS-PAGE 检验蛋白质的表达水平[7]。

1.4.3 CotA 漆酶的酶活测定及 SDS-PAGE 分析 酶活力单位(U):1 min 内氧化 1 μmol ABTS 所需的漆酶量。

酶反应体系:预先将 2.4 mL 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液和 500 μL 的 3 mmol/L 的 ABTS 充分混匀,并于 50 ℃条件下水浴 5 min。紧接着迅速加入 100 μL 稀释好的 CotA 漆酶溶液。用分光光度计记录 420 nm 波长下的读数[8]。

漆酶酶活的计算公式如下:

$$\text{酶活/(U/L)}=\frac{\Delta_{OD}\times V_1\times n}{\Delta_t\times V_2\times\varepsilon\times10^{-6}}$$

式中,Δ_{OD} 为起始和结束时的吸光度差值;V_1 为反应体系的总体积(mL);n 为酶液的稀释倍数;Δ_t 为反应时间(min);V_2 为体系中酶液的体积(mL);ε 为摩尔消光系数(L/(mol·cm))。

1.4.4 酶学性质分析 最适 pH:在 50 ℃下,将反应体系放置在不同 pH(2.0~11.0)的缓冲液中,测定酶活,以最高酶活为 100%,比较获得最适反应 pH。

最适温度:在最适反应 pH 条件下,将反应体系分别在不同的温度(30、40、50、60、70、80、90、100 ℃)条件下测酶活,以最高酶活为 100%,得到漆酶的最适反应温度。

pH 稳定性:将酶液放置在不同 pH 的缓冲液

中,4 ℃孵育 5 h,以最高酶活为 100%,测定其剩余酶活。

热稳定性测定:在最适反应 pH 条件下,将漆酶置于不同的温度梯度(30~90 ℃)条件下孵育 2 h,以最高酶活为 100%,测定 CotA 漆酶的剩余酶活。

动力学参数的测定:在上述的最适 pH 和 50 ℃条件下,以 ABTS 作为底物检测漆酶酶活。配置不同浓度的 ABTS(浓度为 0.02~0.50 mmol/L)研究反应动力学。动力学参数 K_m 和 K_{cat} 利用 Michaelis-Menten equation 计算[9]。

1.4.5 BP 神经网络模型建立及萤火虫算法寻优 以发酵培养基中的蛋白胨、酵母粉、NaCl、$CuSO_4$、甘油这 5 个因素作为 BP 神经网络模型的输入单元,以重组 CotA 漆酶的酶活作为输出单元建立神经网络。同时利用萤火虫算法寻优确定神经网络的权值。本实验中 BP 神经网络的建立及萤火虫寻优算法使用 MATLAB 2014a 软件进行。

1.4.6 染料脱色应用 使用纯化后的漆酶对甲基红(λ_{max}=410 nm),孔雀石绿(λ_{max}=619 nm),溴百里香酚蓝(λ_{max}=420 nm),酸性蓝 129(λ_{max}=629 nm)进行染料脱色研究。脱色体系:10 U 的 CotA 漆酶,0.5 mL 乙酰丁香酮(10 mmol/L),染料 1 mL(0.025 mg/mL),3.5 mL 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(100 mmol/L,pH 3.5)。将脱色体系(以不加酶的体系作为对照)置于 50 ℃水浴摇床上脱色 5 h,然后计算脱色率。脱色率计算公式如下:

$$脱色率=\frac{A_1-A_2}{A_1}\times 100\% \quad (2)$$

式中,A_1 为对照组的吸光度值;A_2 为实验组的吸光度值。

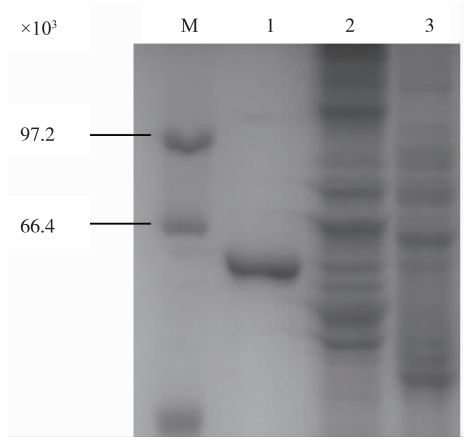
2 结果与分析

2.1 CotA 漆酶重组大肠杆菌构建

通过 PCR 扩增获得短小芽孢杆菌 W3 的 CotA 基因,然后通过双酶切构建重组质粒并转化大肠杆菌。测序验证得到重组菌株 pET-22b-CotA 构建成功。

2.2 诱导表达及蛋白质纯化结果

按照 1.3.2 的方法诱导表达 CotA 漆酶,经镍柱纯化,脱盐柱脱盐和 SDS-PAGE 分析,结果如图 1 所示,泳道 1 为纯化后的 CotA 漆酶蛋白质,大小约 6.5×10^4,与 ExPASy 软件预测的蛋白质大小一致。



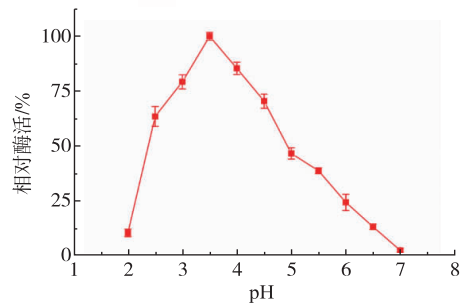
M:蛋白胶 Marker;1:纯化后的 CotA 漆酶蛋白质;2:pET-22b-CotA 漆酶粗酶;3:空载 pET-22b.

图 1 CotA 漆酶的 SDS-PAGE 分析

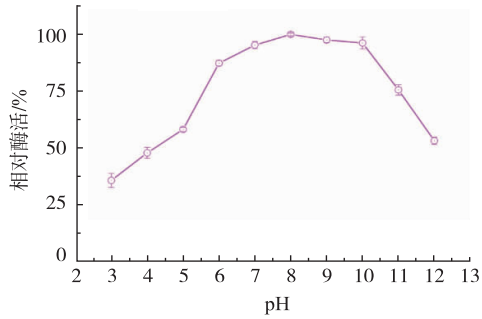
Fig. 1 SDS-PAGE analysis of CotA-laccase

2.3 CotA 漆酶酶学性质分析

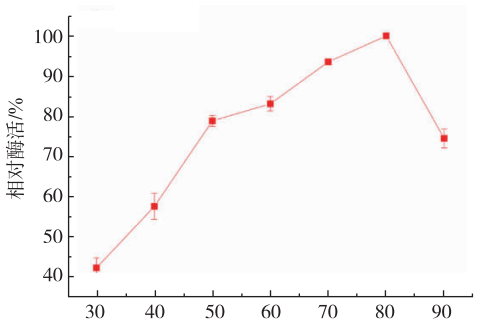
经一系列的酶活测定,重组表达的 CotA 漆酶最适 pH 值在 3.5 左右,能够耐受 pH 6~12 的环境,保持 50%以上的酶活(见图 2(a)(b))。重组表达的 CotA 漆酶最适温度为 80 ℃,在 80 ℃下孵育 2 h 后依然可以检测到 40%的酶活性(见图 2(c)(d))。以 ABTS 作为底物时,经计算得到 K_m 为 0.247 mmol/L,K_{cat} 为 41.32 s^{-1},说明重组表达的 CotA 漆酶具有耐高温和耐碱性环境的特点,具有适合工业染料脱色应用的潜力。



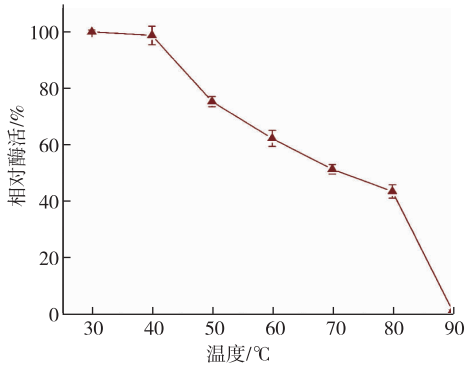
(a)CotA漆酶的最适pH



(b)CotA漆酶的pH稳定性



(c)CotA漆酶的最适温度



(d)CotA漆酶的热稳定性

图 2　酶学性质分析

Fig. 2　Enzymatic properties of CotA-laccase

2.4　BP 神经网络的建模

以 16 组重组大肠杆菌发酵 CotA 漆酶的五因素四水平正交实验数据结果进行 BP 神经网络建模。选取 12 组数据作为训练集,选取其余 4 组数据作为测试集来检验模型。BP 神经网络的输入为发酵培养基中的蛋白胨、酵母粉、NaCl、$CuSO_4$ 和甘油,输出为重组 CotA 漆酶的酶活。经训练比较后确定了隐含层神经元个数为 3。确定了神经拓扑结构为 5-3-1 的模型,见图 3。

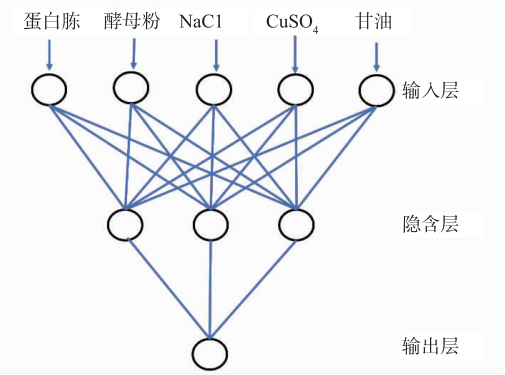


图 3　BP 神经网络拓扑图

Fig. 3　BP neural network topology

经过 12 次迭代后神经网络模型的最佳验证性能达到了 0.000 403 34（见图 4）。决定系数 R^2 为 0.973 41,说明该神经网络模型模拟效果良好,模拟效果见表 1、图 5。

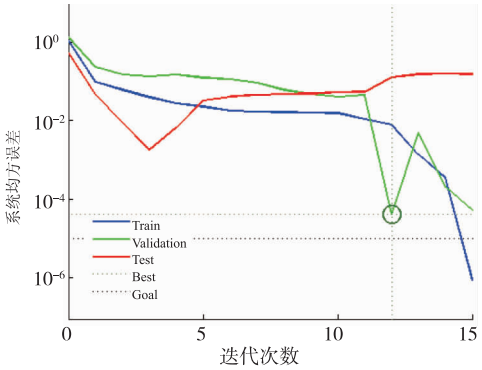


图 4　BP 神经网络最佳验证性能

Fig. 4　Optimal verification performance of BP neural network

表 1　BP 神经网络拟合结果

Table 1　Fitting results of BP neural network

组号	蛋白胨质量浓度/(g/dL)	酵母粉质量浓度/(g/dL)	NaCl质量浓度/(g/dL)	$CuSO_4$ 浓度/(mol/L)	甘油体积分数/%	酶活/(U/L)
1	0.6	0.3	0.6	0.15	0.6	497.41
2	0.6	0.4	0.8	0.20	0.8	271.50
3	0.6	0.5	1.0	0.25	1.0	1 101.17
4	0.6	0.6	1.2	0.30	1.2	1 688.20
5	0.8	0.3	0.8	0.25	1.2	977.24
6	0.8	0.4	0.6	0.30	1.0	970.83
7	0.8	0.5	1.2	0.15	0.8	447.23
8	0.8	0.6	1.0	0.20	0.8	1 007.67
9	1.0	0.3	1.0	0.30	1.0	2 634.72
10	1.0	0.4	1.2	0.25	0.8	2 643.25
11	1.0	0.5	0.6	0.20	1.2	316.50
12	1.0	0.6	0.8	0.15	1.0	727.92
13	1.2	0.3	1.2	0.20	1.0	2 315.33
14	1.2	0.4	1.0	0.15	1.2	485.83
15	1.2	0.5	0.8	0.30	0.6	476.25
16	1.2	0.6	0.6	0.25	0.8	1 915.33

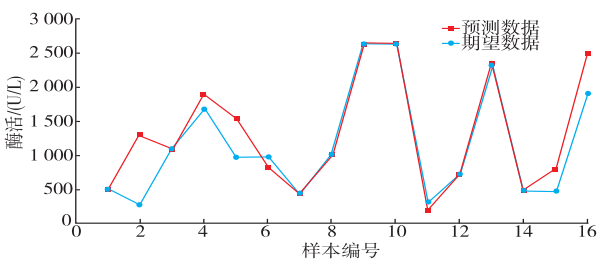


图 5　BP 神经网络拟合结果

Fig. 5　Fitting results of BP neural network

2.5 萤火虫算法寻优

经过萤火虫算法寻优获得,重组大肠杆菌发酵产 CotA 漆酶培养基中的蛋白胨、酵母粉、NaCl、$CuSO_4$ 和甘油分别为 1.16 g/dL、0.428 g/dL、1.06 g/dL、0.274 mol/L 和 0.931%(体积分数) 时，预测重组 CotA 漆酶的酶活达到了最大(2 830.23 U/L)。

2.6 模拟效果验证

以 BP 神经网络和萤火虫算法寻优获得的最佳培养基组成进行重组大肠杆菌发酵,重复 3 次获得实际发酵生产的重组 CotA 漆酶酶活达到了 3 088.68 U/L,相比未优化前提高了 61.26%。

2.7 染料脱色应用

CotA 漆酶对 4 种染料的脱色效果如图 6 所示。CotA 漆酶对 4 种染料都具有不同程度的脱色能力,其中对孔雀石绿和酸性蓝脱色效果尤其明显,脱色效果接近 90%。

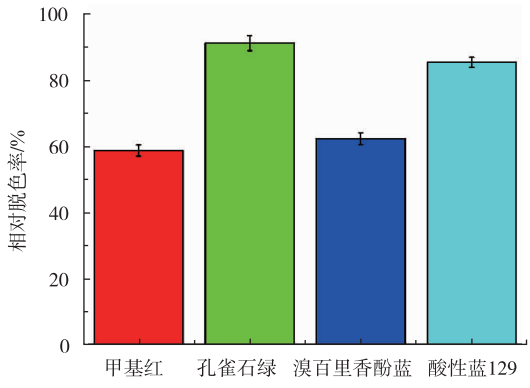


图 6 染料脱色效果

Fig. 6 Dye decolorization

2.8 讨论

细菌漆酶由于具有良好的热稳定性和耐受碱性环境的能力而在工业废水处理和有毒物质的降解中具有良好的应用前景[10]。S.Basheer 等从芽孢杆菌 R5 菌株中筛选到了高热稳定性的漆酶[11]。Wang 等成功克隆了芽孢杆菌 WD23 来源的 CotA 漆酶并用于染料的脱色[12]。M.Kumar 等克隆表达了来自 *Pandoraea* sp. ISTKB 来源的新型嗜热漆酶[13]。各种新的细菌漆酶正在不断地被人们挖掘和利用。同时,关于漆酶发酵的优化也是当前研究的一个重要内容。培养基的成分优化是发酵过程优化的第一步也是关键的一步。传统的培养基优化方法都是通过响应面分析,但是响应面分析采用多元二次回归方程作为拟合的基础，这就意味着如果影响因素在 3 个以上的话就必须通过其他方法进行降维。同时,响应面也会带来巨大的工作量,例如五因素三水平的响应面分析就需要 46 组实验，而本实验中只使用了 16 组就达到了良好的拟合效果，说明人工神经网络在生物建模和非线性拟合方面具有减少工作量的优点。近年来也有越来越多的人工神经网络优化发酵的相关报道,如 Peng 等通过 BP 神经网络和遗传算法优化了类胡萝卜素发酵培养基,使类胡萝卜素产量提高了 95.9%[14]。Ting 等利用 BP 神经网络优化了毕赤酵母发酵培养基高效表达 β-葡萄糖苷酶[15]。王强等通过 BP 神经网络偶联遗传算法优化三孢布拉霉发酵培养基,使番茄红素产量提高了 31.6%[16]。

3 结 语

综上所述,本实验中通过分子克隆的手段将短小芽孢杆菌 CotA 漆酶克隆到了 pET-22b 质粒上并构建了重组大肠杆菌，重组表达的 CotA 漆酶相对分子质量大约 6.5×10^4,以 ABTS 作为底物测得反应的最适pH 值为 3.5,最适温度为 80 ℃。重组表达的 CotA 漆酶在 pH 3.5 和 50 ℃的条件下对 4 种工业染料具有明显的脱色效果,其中对孔雀石绿和酸性蓝 129 脱色率达到了 90%左右。在实际的印染工艺中,酸性蓝等酸性染料应用的 pH 值为 4 左右[17]。而酸性蓝染料废水的处理一般需要花费大量的碱性物质将 pH 值调到 6 左右[18]。本实验中的重组 CotA 漆酶能够直接在酸性条件下直接对酸性蓝脱色,因此重组 CotA 漆酶在酸性染料废水的处理方面具有应用潜力。本实验中利用 BP 神经网络组合萤火虫算法寻优得到最佳产重组 CotA 漆酶的发酵培养基成分为:蛋白胨 1.16 g/dL、酵母粉 0.428 g/dL、NaCl 1.06 g/dL、$CuSO_4$ 0.274 mol/L 和甘油 (体积分数) 0.931%。优化过的培养基产 CotA 漆酶酶活为 3 088.68 U/L,相比未优化之前提高了 61.26%。本研究中优化后的 CotA 漆酶产量明显高于已报道的重组短小芽孢杆菌 LC01 漆酶产量[19]。与报道的枯草芽孢杆菌漆酶 cjp3 的最大酶活仍有差距[20],但是这只是摇瓶实验所得产量,仍然具有很大的潜力。可见利用 BP 神经网络建模结合萤火虫算法来优化 CotA 漆酶发酵培养基是一种可行的手段。

参考文献:

[1] SIDY B A,VINOTH K V. Recent developments in the use of tyrosinase and laccase in environmental applications[J]. **Critical Reviews in Biotechnology**,2017 37(7):1-14.

[2] LIU H P,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):0119833.

[3] GAUR N,NARASIMHULU K,PYDISETTY Y. Biochemical and kinetic characterization of laccase and manganese peroxidase from novel *Klebsiella pneumoniae* strains and their application in bioethanol production[J]. **RSC Advance**,2018,8(27):15044-15055.

[4] ISLAM M M,XIN Y. Evolving artificial neural network ensembles[J]. **Computational Intelligence Magazine IEEE**,2008,3(1):31-42.

[5] WANG G G,GUO L H,DUAN H,et al. A new improved firefly algorithm for global numerical optimization[J]. **Journal of Compu–tational and Theoretical Nanoscience**,2014,11(2):477-485.

[6] MOROWVAT M H,BABAEIPOUR V,RAJABIMEMARI H,et al. Overexpression of recombinant human beta interferon (rhINF-β) inperiplasmic space of *Escherichia coli*[J]. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**,2014,13(Suppl):151-160.

[7] SCHÄGGER H. Tricine-sds-page[J]. **Nature Protocol**,2006,1(1):16-22.

[8] LUO Q,CHEN Y,XIA J,et al. Functional expression enhancement of *Bacillus pumilus* CotA-laccase mutant WLF through site-directed mutagenesis[J]. **Enzyme and Microbial Technology**,2018,109:11-19.

[9] ENGLISH B P,MIN W,VAN O A,et al. Ever-fluctuating single enzyme molecules:michaelis-Menten equation revisited[J]. **Nature Chemical Biology**,2006,2(2):87-94.

[10] JIN L N,YANG X,SHENG Y J,et al. The second conserved motif in bacterial laccase regulates catalysis and robustness[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2018,102(15):1-10.

[11] BASHEER S,RASHID N,AKRAM M S,et al. A highly stable laccase from *Bacillus subtilis* strain R5:gene cloning and characterization[J]. **Biochemistry & Molecular Biology**,2019,83(3):436-445.

[12] WANG C L,CUI D Z,LU L,et al. Cloning and characterization of CotA laccase from *Bacillus subtilis* WD23 decoloring dyes[J]. **Annals of Microbiology**,2016,66(1):461-467.

[13] KUMAR M,MISHRA A,SINGH S S,et al. Expression and characterization of novel laccase gene from *Pandoraea* sp. ISTKB and its application[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2018,115:308-316.

[14] PENG F,LI A M. Optimization of carotenoid fermentation medium of by BP neural network and genetic algorithm[J]. **Chinese Journal of Applied & Environmental Biology**,2008,14(6):834-837.

[15] ZHANG T,WU J L,NASIR A,et al. High level expression of β-glucosidase by recombinant *Pichiapastoris* through the one-phase fermentation based on cheap medium optimized by back-propagation neural network-genetic algorithm[J]. **Journal of Bioprocess Engineering & Biorefinery**,2014,3(1):50-56.

[16] 王强,冯玲然,余晓斌. 基于 BP 神经网络和遗传算法优化番茄红素发酵培养基[J]. 食品与生物技术学报,2019,38(2):111-119.

[17] 张晓峰,曹机良,孟春丽,等. 锦纶织物的 MZ 酸性染料染色[J]. 印染,2015(14):22-24.

[18] 王代芝,周珊,揭武. 用改性粉煤灰处理酸性蓝染料废水的研究[J]. 粉煤灰综合利用,2004(5):32-33.

[19] 李成名,王佳懿,卢磊. 短小芽孢杆菌 LC01 漆酶基因在毕赤酵母中的胞外表达及重组漆酶酶学性质研究[J]. 生物技术通报,2018,34(3):185-193.

[20] QIAO W C,CHU J P,DING S J,et al. Characterization of a thermo-alkali-stable laccase from *Bacillus subtilis* cjp3 and its application in dyes decolorization[J]. **Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substance & Environmental Engineering**,2017,52(8):710-717.