

# 从土壤中筛选产漆酶微生物菌株的研究

王剑锋<sup>1,2</sup>, 刘建玲<sup>1</sup>, 王 璋<sup>1</sup>

1(中国食品发酵工业研究院, 北京, 100027) 2(西北大学生命科学学院, 陕西西安, 710069)

**摘 要** 根据漆酶催化特定底物氧化还原反应结果的特征, 设计了1个以采用愈创木酚和 $\alpha$ -萘酚作为产酶菌株限制性驯化因素并结合木质素作为产酶诱导强化剂的筛选模版, 在对保藏和外购的常见微生物菌株进行产酶性能分析, 发现不能产酶或活性很低后, 从土壤中分离得到40株产酶微生物。在经过进行选择性的初筛分析和摇瓶发酵测定酶活的复筛试验的一系列反复筛选驯化比较, 得到了3株分泌酶活力较高的丝状真菌 W-E2、W-H1 和 W-I2 菌株, 其胞外漆酶活力分别为 155.4 U/mL、172.3 U/mL 和 188.2 U/mL, 显示出了十分有效的开发潜力。

**关键词** 漆酶, 土壤分离, 菌种选育, 丝状真菌, 细菌

漆酶(laccase, 即苯二酚:氧氧化还原酶, benzenediol: oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2), 是一种结合多个铜离子的多酚氧化酶, 广泛存在于自然界的许多物种, 包括动物、植物、真菌和细菌<sup>[1-2]</sup>。迄今为止, 在国内外已有众多关于产酶菌种的相关研究报道, 但基本上都是大型真菌或木质素降解的白腐菌, 而这些担子菌类微生物大多生长非常缓慢, 发酵培养周期长, 容易染菌, 生活史比较复杂等, 这些因素明显限制了它们的工业应用。

探索漆酶的高效生产, 菌种的优异性是关键, 通常需要具有目标产物生成量大、安全、易培养、繁殖生长快速等特点。本研究对各种常见微生物在液态培养下生物合成漆酶的产酶规律进行了初步分析比较, 根据该酶所催化的氧化还原反应及其结果的特性, 设计了一个利用经济性的酶作用底物的简易、有效快速测定试验方法, 并作为菌株分离和初筛分析手段, 对包括本实验室目前保存以及外购和从土壤分离得到的数十种细菌、酵母和丝状真菌等微生物菌种的产酶性能进行分析评价, 制定出了分离筛选生产胞外漆酶微生物菌种的新筛选模型, 结果大大提高了初筛的工作效率, 分离选育得到3株产酶微生物菌株, 有助于今后工业化生产开发应用。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) WZFF. W-1088、假单胞杆菌(*Pseudomonas* sp.) WZFF. G-350、纺锤链霉菌(*Streptomyces netropsis*) WZFF. B-12、新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)

WZFF. W-15、假丝酵母(*Candida* sp.) WZFF. G-284、黑曲霉(*Aspergillus niger*) WZFF. W-a317、橘青霉(*Penicillium citrinum*) WZFF. W-p410, 为本实验室保藏菌种。

地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) CM-MCC 1.813、兰色链霉菌(*Streptomyces cyaneus*) CGMCC 4.1236、玫瑰色侧孢霉(*Sporotrichum pulchellum*) CGMCC 3.3723、构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*) CGMCC 3.3916、粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*) CGMCC 3.1604、野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris*) CGMCC 1.1653 和大肠杆菌(*Escherichia coli*) CGMCC 1.2021, 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心; 巴斯德毕氏酵母(*Pichia pastoris*) JCM3650, 购自日本理化学研究所。

### 1.2 土壤样品

参照土样采集标准方法<sup>[3]</sup>, 采集北京地区的14个土样, 时间为2004年10月7日至11月10日。采样时先除去表层5cm表土, 取5~15cm深的土壤, 5点采集, 每份样品重约500g, 同时记录地理位置、当时地质条件、气候等各种周边环境状况。土样01号~08号来自北京郊区杨树林下腐叶土, 土样09号~14号来自京郊菜园的腐熟堆肥。

### 1.3 培养基

#### 1.3.1 菌种扩培和斜面保藏培养基

细菌和放线菌采用营养肉汁琼脂, 酵母和丝状真菌采用PDA培养基, 其中马铃薯汁以新鲜马铃薯制备(下同)。

#### 1.3.2 菌种分离培养基

牛肉膏蛋白胨培养基(g/L): 牛肉膏3、蛋白胨10、NaCl 5、琼脂15, pH7.2~7.4。

#### 1.3.3 产酶微生物分离选择培养基

第一作者: 硕士研究生(王璋为通讯作者)。

收稿日期: 2007-06-15, 改回日期: 2007-08-29

愈创木酚营养肉汁琼脂(G-NA):营养肉汁琼脂灭菌后添加经无菌过滤器除菌的愈创木酚—乙醇溶液,使愈创木酚的最终浓度为0.04%。

$\alpha$ -萘酚营养肉汁琼脂( $\alpha$ N-NA):制法同G-NA,以 $\alpha$ -萘酚替代愈创木酚。

愈创木酚PDA(G-PDA):制法同G-NA,以PDA替代营养肉汁琼脂。

$\alpha$ -萘酚PDA( $\alpha$ N-PDA):制法同G-PDA,以 $\alpha$ -萘酚替代愈创木酚。

木质素降解选择培养基(LDSM):麸皮水解液(以干麸皮木质素计)0.3g、 $K_2HPO_4$  1.0g、NaCl 0.5g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.3g、 $NaNO_3$  2.5g、 $CaCl_2$  0.1g、 $FeCl_3$  0.01g、水1 000 mL、pH 7.4。

愈创木酚-木质素降解选择培养基(GLDS):在木质素降解选择培养基中加入愈创木酚,使其终浓度为0.04%。

$\alpha$ -萘酚-木质素降解选择培养基(NLDS):在木质素降解选择培养基中加入 $\alpha$ -萘酚,使其终浓度为0.5 mmol/L。

#### 1.3.4 液体产酶培养基(g/L)

马铃薯200、蔗糖20、 $K_2HPO_4$  3、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1.5、pH自然。

#### 1.4 常见微生物菌种的漆酶生产分析

实验室保藏以及外购的细菌、放线菌、酵母、丝状真菌的典型微生物菌种经斜面活化,制备成菌悬液,适当稀释后,取0.2 mL细菌和放线菌稀释液分别涂布在G-NA、 $\alpha$ N-NA、GLDS和NLDS平板上,取0.2 mL酵母和丝状真菌稀释液分别涂布在G-PDA、 $\alpha$ N-PDA、GLDS和NLDS平板上,30℃恒温培养。每1样品各种平板各作2个平行,每天定时观察菌落形态,测量菌丝圈、变色圈直径,记录变色圈颜色深浅以分析判断漆酶生产能力。

#### 1.5 土壤微生物的分离

每1份土样均分成2份,1份置于40℃烘箱中烘

2h以减少细菌的存活量,然后以10倍稀释法适当稀释后,取2mL接入装50mL LDSM的三角瓶,30℃、20 r/min摇瓶培养5d后,取培养液0.2 mL分别涂布在G-PDA和 $\alpha$ N-PDA平板上。另1份无菌适当稀释土样溶液取0.2 mL,同样涂布在G-PDA和 $\alpha$ N-PDA平板上,30℃恒温培养。每1样品各种平板各作3个平行,观察记录漆酶生产能力,并从平板挑取具产酶潜力的生长菌落进行初筛。

#### 1.6 产酶土壤微生物的初筛

对上述挑出菌株进行斜面活化,制备成菌体或孢子悬液,并适当稀释后,取0.2 mL分别涂布在GLDS和NLDS平板上,30℃恒温培养。同样观察,记录漆酶生产情况,挑选性能优良菌落,传代培养2~3代,斜面保藏备用。

#### 1.7 产酶菌株的复筛

对初筛出的产酶菌株具体定量测定漆酶活性,进行高产酶菌株的复筛。菌种斜面活化后接种于液体产酶培养基中,30℃摇瓶培养4d后,测定菌体细胞干重(DCW)和漆酶活力,同样做3个平行样进行分析。

#### 1.8 酶活测定方法

发酵培养液经3 000 r/min离心10 min后,上清液作为粗酶液。酶活测定采用根据Coll等的比色法<sup>[4]</sup>进行改良的方法<sup>[5]</sup>。1个酶活单位(1U)定义为1 min内将1 $\mu$ mol愈创木酚氧化所需的酶量。

### 2 结果与讨论

#### 2.1 常见微生物菌种的漆酶生产分析

首先根据漆酶本身的性质、催化作用特征以及微生物生产漆酶的代谢作用特性而设计的各种产酶菌株分离选择性培养基平板,对一些本实验室保藏以及外购的典型微生物菌株的生长状况进行比较分析,培养7 d后菌体生长及菌落大小、漆酶催化氧化还原反应产生的变色圈直径平均值及其变色圈颜色深浅程度的实验观察结果如表1表示。

表1 常见细菌和放线菌在产酶微生物分离选择培养基平板的培养结果

类别	菌株	G-NA		$\alpha$ N-NA	
		a	b	a	b
细菌	大肠杆菌 CGMCC 1.2021	+(2)	0(-)	+(2)	0(-)
	假单胞杆菌 WZFF. G-350	+(2)	0(-)	+(1)	0(-)
	枯草杆菌 WZFF. W-1088	+(3)	0(-)	+(2)	0(-)
	地衣芽孢杆菌 CGMCC1.813	+(3)	0(-)	+(2)	0(-)
	野油菜黄单胞菌 CGMCC 1.1653	+(2)	0(-)	+(3)	0(-)
放线菌	纺锤链霉菌 WZFF. B-12	-(0)	0(-)	-(0)	0(-)
	兰色链霉菌 CGMCC4.1236	+(4)	0(-)	+(1)	0(-)

注:a,表示菌体生长状况(+生长,-不生长),括号中表示菌落圈直径(mm);b,表示变色圈直径(mm),括号中表示颜色深度(-无反应,+,较强,++强)。

从表1中看出,这些细菌和放线菌在2种产酶选择平板上都能生长,但菌落偏小,生长速度很缓慢,都不生产漆酶,没有形成变色圈。而且培养后在这些生长的小菌落上滴加0.04%愈创木酚乙醇溶液或 $\alpha$ -萘酚乙醇溶液,也未观察到黄红色或紫色圈出现。另外,在

GLDS和NLDS平板上也是同样的结果,说明这些常见细菌和放线菌不能生产漆酶。

以同样方法对本实验室保藏以及外购的常见酵母和丝状真菌进行漆酶生产能力的分析结果见表2。

表2 常见酵母和丝状真菌在产酶微生物分离选择培养基平板的培养结果

类别	菌株	G-PDA		$\alpha$ N-PDA		GLDS		NLDS	
		a	b	a	b	a	b	a	b
酵母菌	新型隐球菌 WZFF, W-15	+	(4)	0	(-)	+	(3)	0	(-)
	假丝酵母 WZFF, G-284	+	(3)	0	(-)	+	(3)	0	(-)
	巴斯德毕氏酵母 JCM3650	+	(3)	0	(-)	+	(3)	0	(-)
	黑曲霉 WZFF, W-a317	+	(7)	0	(-)	+	(6)	2	(+)
丝状真菌	构巢曲霉 CMCCC3.3916	+	(8)	0	(-)	+	(7)	0	(-)
	橘青霉 WZFF, W-p410	+	(8)	2	(+)	-	(7)	2	(+)
	玫瑰色侧孢霉 CMCCC3.3723	+	(6)	0	(-)	+	(4)	0	(-)
	粗糙脉孢菌 CMCCC3.1604	+	(9)	2	(+)	+	(10)	4	(+)

愈创木酚既是漆酶的氧化底物又是漆酶生物合成的诱导剂, $\alpha$ -萘酚对于漆酶的产生具有一定促进作用,G-PDA和 $\alpha$ N-PDA的2种选择平板的结合使用可以保证所选出的产酶菌株是漆酶生产菌株,而非愈创木酚氧化酶的生产菌株;而且木质素也是漆酶的作用底物之一,采用木质素作为唯一碳源的GLDS和NLDS有助于漆酶的生物合成。表2结果显示了所有测试菌株在所设计的4种产酶选择平板上都可以生长,但是3株酵母菌和2株丝状真菌都不能合成漆酶,而本实验室保藏的黑曲霉和橘青霉则可以在添加有木质素的GLDS和NLDS平板上呈现出漆酶催化反应产生的显色圈,表明可以产生少量的漆酶。

粗糙脉孢菌虽然在GLDS和NLDS的2种平板上生长状况不如在G-PDA和 $\alpha$ N-PDA的结果好,但在前2个选择平板的漆酶产生效果反而有所增强。总体上,这些常见菌种的产酶水平可能和一些有关粗糙脉孢菌报道3~5 u/mL的结果类似<sup>[7]</sup>,酶活太低而不适合工业发酵生产。因此,有必要进一步分离筛选高产酶菌株。

## 2.2 生产漆酶的土壤微生物菌种分离

将土壤样品经过适当稀释后在G-PDA和 $\alpha$ N-PDA的2种选择平板培养7d后,主要培养结果如表3所示。

各个选择平板上均有少量菌落生长,菌落呈圆形、边缘放射状、表面均显干燥,只有极少数的菌落周边出现变色圈。对于菌落颜色的淡红色、淡黄色、棕色,挑出转接于产酶选择平板培养后,各菌落颜色如故,但在边缘滴加0.04%愈创木酚-乙醇溶液和0.

02% $\alpha$ -萘酚乙醇溶液,未见变色圈出现,说明这些菌落的颜色是菌落自身固有颜色,非漆酶引起的变色反应。

表3 不同土壤样品产酶菌落的筛选

土样编号	变色圈菌落数		挑出菌落编号
	G-PDA	$\alpha$ N-PDA	
01	1	2	W-A1~3
02	3	2	W-B1~5
03	2	1	W-C1~3
04	1	1	W-D1~2
05	2	1	W-E1~3
06	1	4	W-F1~4
07	2	3	W-G1~5
08	1	1	W-H1~2
9	2	1	W-I1~3
10	0	1	W-J1
11	1	1	W-K1~2
12	1	2	W-L1~3
13	2	0	W-M1~2
14	0	2	W-N1~2

从上面产酶微生物选择平板中共筛选出菌落周围具有变色圈的40个菌株,初步确定为产漆酶菌种,转接斜面保藏和进行以下初筛分析用。

## 2.3 漆酶生产菌株初筛

漆酶参与木质素的分解,其分解产物在作为菌体生长所需碳源的同时,对漆酶生物合成具有诱导作用,因而,选择木质素为唯一碳源并分别添加愈创木酚和 $\alpha$ -萘酚的无机盐选择平板GLDS和NLDS,虽然可能减缓菌体细胞生长繁殖速率,但有利于提高选择负荷水平、强化菌种生产漆酶能力,以此着重设计的关键初筛步骤进行漆酶生产微生物筛选试验的结果如表4所示。

表4 产漆土壤微生物菌株在选择平板上的初筛

菌株	GLDS		NLDS		菌株	GLDS		NLDS					
W-A1	+	(39)	32 (++)	+	(44)	40 (++)	W-G1	+	(10)	8 (+)	+	(12)	12 (+)
W-A2	+	(12)	9 (+)	+	(11)	4 (+)	W-G2	+	(25)	25 (++)	+	(33)	27 (++)
W-A3	+	(20)	12 (+)	+	(22)	12 (+)	W-G3	+	(15)	5 (+)	+	(15)	7 (+)
W-B1	+	(15)	14 (+)	+	(12)	13 (+)	W-G4	+	(41)	47 (++++)	+	(47)	43 (+)
W-B2	+	(38)	34 (++)	+	(50)	45 (+)	W-G5	+	(16)	8 (+)	+	(22)	12 (+)
W-B3	+	(8)	10 (+)	+	(10)	11 (+)	W-H1	+	(35)	8 (+)	+	(37)	13 (+)
W-B4	+	(24)	11 (+)	+	(25)	11 (+)	W-H2	+	(53)	47 (++++)	+	(56)	52 (++)
W-B5	+	(48)	31 (++++)	+	(65)	47 (++)	W-I1	+	(53)	47 (++++)	+	(56)	52 (++)
W-C1	+	(17)	9 (+)	+	(23)	14 (+)	W-I2	+	(8)	11 (-)	+	(13)	10 (+)
W-C2	+	(8)	8 (+)	+	(14)	13 (+)	W-I3	+	(28)	13 (+)	+	(24)	10 (+)
W-C3	+	(47)	36 (++++)	+	(42)	39 (+)	W-J1	+	(25)	12 (+)	+	(31)	9 (+)
W-D1	+	(28)	14 (+)	+	(8)	8 (+)	W-K1	+	(56)	37 (++)	+	(50)	42(++)
W-D2	+	(31)	15 (+)	+	(35)	15 (+)	W-K2	+	(45)	14 (+)	+	(35)	8 (+)
W-E1	+	(26)	14 (+)	+	(27)	16 (+)	W-L1	+	(45)	15 (+)	+	(17)	8 (+)
W-E2	+	(69)	71 (+)	+	(44)	44 (++)	W-L2	+	(44)	27 (++++)	+	(48)	32 (++++)
W-E3	+	(22)	10 (+)	+	(24)	10 (+)	W-L3	+	(48)	47 (++)	+	(38)	14 (+)
W-F1	+	(15)	11 (+)	+	(14)	10 (+)	W-M1	+	(44)	10 (+)	+	(37)	17 (+)
W-F2	+	(20)	24 (+)	+	(23)	30 (+)	W-M2	+	(29)	14 (+)	+	(26)	20 (+)
W-F3	+	(12)	6 (+)	+	(13)	12 (+)	W-N1	+	(26)	24 (++)	+	(28)	26 (++)
W-F4	+	(35)	24 (++)	+	(50)	35 (++)	W-N2	+	(12)	4 (+)	+	(14)	4 (+)

实验中发现,大部分的菌株在2种平板上的生长快慢略有差别,如同在表1和表2常见微生物的产漆分析实验所观察到的结果,在添加 $\alpha$ -萘酚的选择平板上的生长速度大于添加愈创木酚的GLDS平板,说明愈创木酚对菌体生长有一定的抑制作用。虽然由于在培养过程中这2种底物对不同菌株菌体细胞生长产生一定的抑制作用,或对漆酶生物合成的诱导作用有差别等种种原因,变色圈的大小与生长圈的大小没有必然的相关性,同一菌株在不同平板上的显色圈相对大小也不完全相同,但大多数菌株呈现出了较好的一致性。在变色圈所显色泽和强度方面,所有显色菌株在同种选择培养基的不同平行平板中都能显示出几乎一致的色泽与直径大小,说明选择平板的稳定性和高度可重复性;大多数菌株在同种平板上显示的颜色比较接近,但不同菌株之间颜色深浅有明显的差别;同一菌株在不同平板上的显色反应也稍有差别,一般在GLDS平板显色圈的色泽深于NLDS平板,可能愈创木酚对漆酶的产生具有一定的诱导作用。但是,也有少部分菌株的颜色深浅不一致,如菌株W-C3和W-G4在NLDS平板上显色较浅,而在GLDS平板上颜色却很深。这些现象的产生除了与菌株所合成漆酶的产量、活力和类型有关外,可能还与不同菌株所产的漆酶对于愈创木酚和 $\alpha$ -萘酚的催化专一性差别有关。

因而,虽然实验中也观察到有少部分白腐真菌菌

株单独以 $\alpha$ -萘酚或愈创木酚作氧化底物时会呈阴性反应,以显色圈的大小和颜色深浅还不能直接作为判断菌株产漆酶能力高低的标准,但是,经过多次反复试验说明可以用本实验所设计的产漆微生物选择培养基分离方法有效地筛选漆酶生产菌株。通过掌握各选择平板的菌落数量,分析在GLDS和NLDS两平板上均同时呈阳性反应显色圈以及结合菌种分离所用的G-PDA和 $\alpha$ N-PDA平板上的表现结果,比较显色圈的大小和深浅程度,可以初步推测判断漆酶的产生程度,并作为后续复筛的依据。其中的13株被挑选出做进一步复筛分析。

另一方面,虽然有报道,在细菌、放线菌中有木质素分解菌种<sup>[2,6]</sup>,国内有一报道从含木质素的碱性土壤和黑液中也分离得到可以产生少量漆酶的嗜碱木质素降解菌<sup>[8]</sup>,但本实验未能在土壤中找到细菌和放线菌类的目标菌株。目前漆酶无论漆树漆酶或真菌漆酶均为糖蛋白,据报道糖基和糖链对漆酶的结构有保护作用,而原核生物缺乏真核生物所具有的进行糖链加工的高尔基体,因而,原核生物一般不能产生传统意义上的漆酶,或者活性非常低,难以常规方法分析检测出,而不能被分离筛选出来。

#### 2.4 漆酶生产菌株复筛

表5表示了采用液体摇瓶发酵分析初筛选出的13株土壤真菌漆酶生产能力的复筛试验结果。

表5 复筛菌株的漆酶活力均值

序 号	菌株编号	DCW g · L <sup>-1</sup>	漆酶活力 / U · mL <sup>-1</sup>
1	黑曲霉 WZFF. W-a317	22.1	1.9
2	橘青霉 WZFF. W-p410	20.6	2.8
3	粗糙脉孢菌 CMCCC3.1604	19.8	5.3
4	W-A1	21.2	94.6
5	W-E2	18.4	121.2
6	W-B5	20.9	111.6
7	W-C3	23.7	96.8
8	W-E2	24.8	155.4
9	W-F4	21.5	103.7
10	W-G2	23.5	84.4
11	W-G4	18.9	56.5
12	W-H1	19.1	172.3
13	W-I2	21.3	188.2
14	W-K1	29.1	66.8
15	W-L2	24.7	102.5
16	W-N1	17.8	79.4

表5中,作为测试对照菌的黑曲霉、橘青霉和粗糙脉孢菌的漆酶活性都很低,但所有初筛菌株都在一定程度上生产漆酶,而且各个菌株的产酶能力和表4的平板培养变色圈的大小有一定的相关性。对这些菌株在PDA以及各种选择培养基平板和液体发酵液的各个阶段进行显微镜观察,都未能发现有锁状联合的存在,判断属于非担子菌类的丝状真菌,这与彭红等<sup>[9]</sup>的报道结果相似。但是,这其中,菌株W-E2(155.4 u/mL)、W-H1(172.3 u/mL)和W-I2(188.2 u/mL)的酶活明显高于相关文献<sup>[9]</sup>的产酶水

平(93 U/mL),完全可以作为复筛选出菌株,在今后进一步提高酶活性能研究方面上得到应用和深入发展。

## 参 考 文 献

- 雷福厚,蓝虹云. 漆酶漆酶和真菌漆酶的异同研究[J]. 中国生漆, 2003, (1): 4~8
- Harald Claus. Laccases and their occurrence in prokaryotes [J]. Arch Microbiol. 2003, 179: 145~150
- 诸葛健,王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京, 中国轻工业出版社, 1994. 335~364
- Coll PM, Fernandez-Abalos JM, Villanueva JR, et al. Purification and characterization of a phenoloxidase (laccase) from the lignin-degrading basidiomycete PM1 (CECT 2971) [J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59(8): 2607~2613
- 王剑锋 苏国成 刘建玲,等. 烟管菌漆酶合成的营养条件研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(2): 20~24
- Alexandre G, Zhulin IB. Laccases are widespread in bacteria [J]. Trends Biotechnol, 2000, 18(1): 41~42
- 堪斌,唐雪明,方惠英,等. 金属铜、锰离子对粗糙脉孢菌漆酶合成的影响[J]. 食品与机械, 2005, 21(3): 24~28
- 管筱武,张甲耀,罗宇焯等. 嗜碱木素降解菌降解能力的初步研究[J]. 中国造纸, 1999, 18(6): 19~22
- 彭红,罗开昆,高中洪,等. 产漆酶真菌的筛选、培养及对苯酚的降解[J]. 华中科技大学学报(自然科学版), 2005, 33(7): 111~114

## Screening of Laccase-producing Microbial Strains from Soil

Wang Jianfeng<sup>1,2</sup>, Liu Jianling<sup>1</sup>, Wang Zhang<sup>1</sup>

1(China National Institute of Food and Fermentation Industries, Beijing 100027, China)

2 (College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China)

**ABSTRACT** According to the properties of the oxy-reduction catalyzed by laccase, an effective screening method to isolate laccase-producing microorganisms from soil was designed by using guaiacol and  $\alpha$ -naphthol as the restrictive selection factors with the addition of lignin as the inducer to enhance the enzyme production. After the analysis for the enzyme productivity of the general microorganisms preserved in our laboratories or purchased from other institutions was carried out and there were no expected laccase activities among these strains, this method was successfully used to isolate out 40 potent laccase-producing microbial strains from soil samples. Three high efficient filamentous fungal strains W-E2, W-H1 and W-I2 were further selected after a serial comparative sieving through the primary screening with this method and secondary isolation by determining the actual laccase activity, and their extracellular laccase activities were 155.4 U/mL, 172.3 U/mL and 188.2 U/mL, indicating a very significant developing potential for industrial production.

**Key words** laccase, soil sample, screening, filamentous fungi, bacteria.