



ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК (547.992.3+547.636.5+547.568.1):(557.152.193.02)

© 1992 г.

*М. Н. Левит, А. М. Шкроб **

ЛИГНИН И ЛИГНИНАЗА

*Институт химической физики РАН, Москва;*** Институт биологической и медицинской химии РАН, Москва*

Несколько лет тому назад установлено, что природные деструкторы лигнина — грибы белой гнили — выделяют гемсодержащие пероксидазы, способные окислять лигниноподобные соединения. Данные об особенностях биосинтеза, строения и свойств этих ферментов, получивших название лигнинпероксидаз или лигниназ, не только создают основу для понимания механизмов биodeградации лигнина, но также значительно расширяют представления о биоорганической химии пероксидазного окисления. Существенно, что лигниназы катализируют окислительное расщепление многих ароматических, гетероциклических и хлороорганических веществ, принадлежащих ныне к числу наиболее опасных загрязнителей окружающей среды. Накопленные сведения позволяют выявить специфику лигниназной активности путем сравнения лигнинпероксидаз с другими окислительными ферментами и сопоставления ферментативного окисления лигнина с конгруэнтными химическими реакциями. Окисленные формы у лигниназы имеют больший редокс-потенциал, чем у других пероксидаз, однако наиболее характерной чертой лигниназного окисления нефенольных моделей лигнина, возможно, является относительно малый вклад гидролитического деалкилирования промежуточных катион-радикалов. Вклад деалкилирования определяет характер окислительной деструкции лигнина и может служить критерием при классификации не только лигниназ, но и других лигнолитических ферментов.

Введение

Бурный рост производства синтетических волокон и развитие безбумажных средств передачи и хранения информации пока не слишком сказываются на характерном для современной цивилизации чрезвычайно высоком уровне потребления целлюлозы. Более того, в последние десятилетия к традиционным путям ее использования добавилось основанное на успехах биотехнологии производство сахаров, спиртов и других низкомолекулярных веществ.

Так или иначе, любой путь утилизации целлюлозы сопряжен с необходимостью делигнификации растительного материала. Этот термин объединяет разнообразные энергоемкие и экологически опасные процедуры, имеющие целью отделить целлюлозу от ее постоянного спутника — высокомолекулярного вещества, именуемого лигнином.

Как правило, при делигнификации древесины лигнин превращают в водорастворимые продукты. Это происходит, например, при длительном нагревании древесины в растворе сульфида натрия и щелочи (крафт-процесс) или сульфита натрия (сульфитная варка). Огромные количества образующихся серосодержащих производных лигнина не находят применения и должны быть в идеале обезврежены и уничтожены, в действительности же загрязняют и отравляют реки и озера.

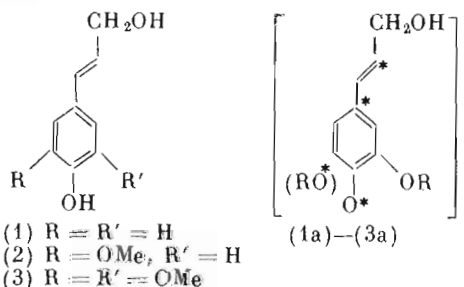
Многие из «вечных проблем» целлюлозно-бумажной и лесохимической

промышленности могут быть хотя бы частично решены при разумном технологическом использовании биологических методов делигнификации, основанных на применении либо грибов и бактерий — природных деструкторов лигнина, либо выделенных из них лигнолитических ферментов, получивших название лигниназ. Это одно из самых молодых направлений биотехнологии стало интенсивно развиваться после того, как такие ферменты удалось выделить, охарактеризовать и установить механизм их действия. Лигниназы оказались гемсодержащими пероксидазами, способными окислять не только лигниноподобные вещества, устойчивые к действию других окислительных ферментов, но также полициклические канцерогенные углеводороды, хлорсодержащие пестициды и даже диоксины. Более того, изучение условий проявления и механизма лигниназной активности открывает новые направления для использования других пероксидаз и разработки биомиметических химических методов окисления как лигнина, так и других веществ. В результате за последние пять-шесть лет химия и биохимия лигнина, оттесненные было на периферию «большой биологии», приобрели второе дыхание и привлекают все возрастающий интерес как исследователей, так и практиков. Этот интерес в значительной мере может быть удовлетворен рядом превосходных обзоров [1—10]. Тем не менее мы находим оправдание своей попытке заново рассмотреть проблему лигниназ не только в желании ознакомить с ней советского читателя (для этого был бы достаточен перевод), но и в стремлении изложить некоторые аспекты этой проблемы, опираясь на результаты собственных исследований.

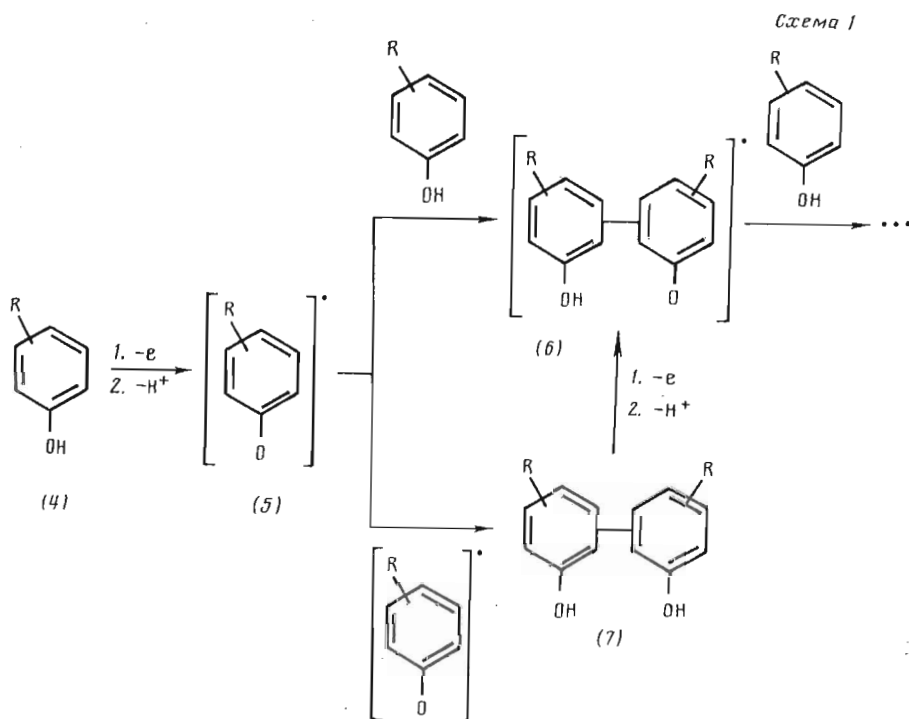
1. Лигнин: место в природе, структура, биосинтез и биодеградация

Лигнин наряду с целлюлозой является важнейшим компонентом тканей высших растений. Для таких растений характерны специализированные органы (корни, стебли, листья) и сосудистые ткани, выполняющие проводящие и опорные функции, которые потребовались при эволюционном переходе к наземному существованию. Водоросли питательными веществами снабжает окружающая вода, и она же поддерживает их тело.

Существуют два вида сосудистой ткани — ксилема (древесина) и флоэма (луб). Сосуды ксилемы образуются при слиянии вытянутых клеток (трахеид). Именно здесь синтезируется лигнин, который окружает целлюлозные микрофибриллы в клеточных стенках и заполняет межклеточное пространство. В результате целлюлоза и лигнин образуют композитный материал, прочность которого позволяет сосудам ксилемы выдерживать большое гидростатическое давление и определяет механические свойства древесины в целом. У папоротников, голосеменных и покрытосеменных растений лигнин составляет 20—30% их сухого веса, во мхах его нет [2, 6, 10].

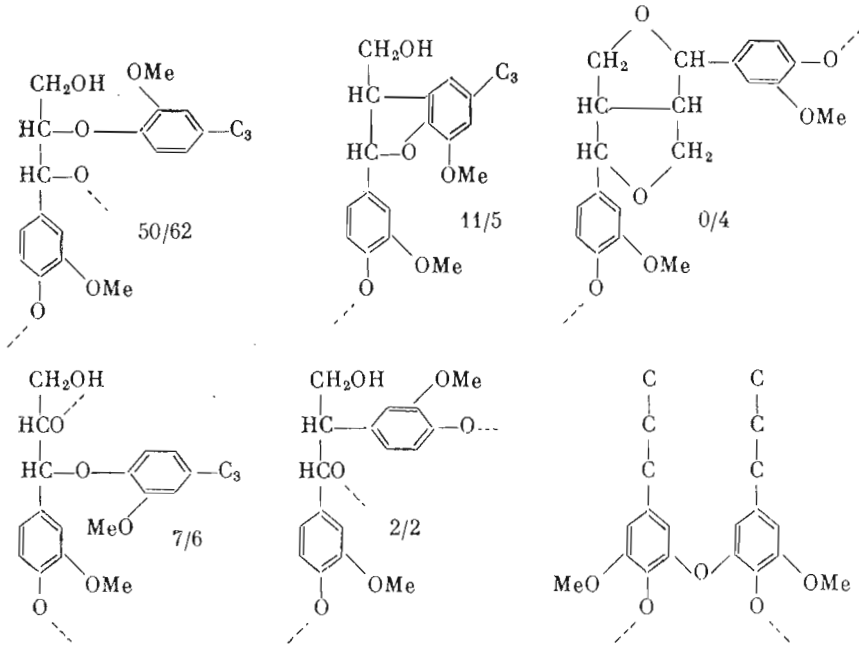


Лигнин — полимерное вещество, по типу структуры принципиально отличающееся от практически всех других биополимеров. Это различие



определяется уникальностью механизма его биосинтеза. Биосинтетические предшественники лигнина — *п*-кумарилловый (1), кониферилловый (2) и синаниловый (3) спирты, имеющие фенилпропановый углеродный скелет, образуются в растениях при дезаминировании и гидроксировании фенилаланина и тирозина. Биосинтез лигнина является результатом окисления этих фенолоспиртов, представляя собой частный случай хорошо известного окислительного сочетания фенолов [11] (см. схему 1). Подобные реакции начинаются с химического (ферментативного) одноэлектронного окисления фенола (фенолята) (4). В результате сразу или после депротонирования первичного катион-радикала возникает феноксильный радикал (5) с делокализованной спиновой плотностью. Этот радикал атакует молекулу фенола с образованием димерного радикала (6), инициируя таким образом цепную поликонденсацию. Возможна также рекомбинация радикалов, приводящая к димерному фенолу (7), способному также подвергаться окислению. Региоспецифичность этих реакций зависит от природы и положения заместителей в фенолах, которые определяют распределение электронной и спиновой плотности, а также пространственные взаимодействия.

Аналогично протекает и биосинтез лигнина [1, 10, 12]. Мономерные предшественники мигрируют по растению в виде фенольных гликозидов, что предохраняет их от преждевременного окисления. В нужном месте — в клеточной стенке и в межклеточном пространстве — сахарная защита удаляется β -гликозидазами [1], а локализованные там же пероксидазы и оксидазы катализируют одноэлектронное окисление мономеров. В радикалах (1а) — (3а), образующихся из мономеров, спиновая плотность распределена между феноксильным кислородом, ароматическим ядром и



Основные типы связей между мономерными единицами в лигнине. Штриховыми линиями обозначены связи с другими единицами. Числа отражают частоту данного типа связи (в %) в лигнинах ели/березы [14]

сопряженной с ним винильной группой (показано звездочками). В свою очередь и в молекулах мономеров — ненасыщенных фенолоспиртов существует несколько положений, особо предпочтительных для атаки радикалов. В результате при окислительной конденсации лигниновых мономеров возникает около 15 типов С—С- и С—О-связей. Сложность структуры полимера обусловлена и тем, что в реакции участвует не один, а три мономера, различающиеся положением и степенью предпочтения мест образования связей. На схеме 2 изображены фрагменты лигниновой макромолекулы, включающие наиболее распространенные типы связей между мономерами (остатки синацилового спирта встречаются только во фрагментах типа левого верхнего). Чаще всего в связывании мономеров участвует фенольный кислород, однако некоторые фенольные группы в лигнине остаются свободными (в среднем одна на 10 звеньев [6]). Благодаря этому лигнин способен к дальнейшей конденсации при дополнительном окислении. Лигнин далеко не единственное природное соединение, образующееся при окислительном сочетании фенолов. Пожалуй, классическим примером здесь может служить усниновая кислота, антибиотик, продуцируемый некоторыми лишайниками [13].

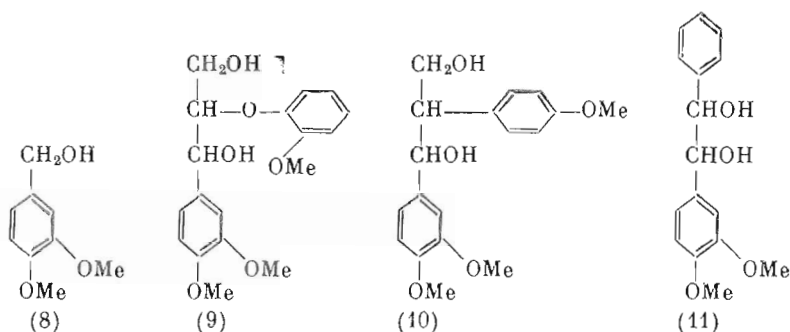
Лигнин — это трехмерный, сетчатый, оптически не активный гетерополимер, лишенный всякой упорядоченности. Все имеющиеся данные показывают, что окислительное сочетание протекает статистически с участием свободных радикалов и его направление не определяется специфичностью окислительных ферментов. Вместе с тем несомненно, что на структуре лигнина должно сказываться соотношение скоростей гидролиза гликозидов и собственно окисления, которое контролирует стационарные концентрации фенолоспиртов и их радикалов.

Состав лигнина зависит от вида растений, типа тканей, места локализации лигнина в клеточной стенке [3]. Так, например, лигнин хвойных

растений практически полностью состоит из остатков кониферилового спирта, а лигнин покрытосеменных растений содержит также синапильные и небольшое количество *n*-кумарильных остатков. Ясно, что участие в окислительной конденсации нескольких предшественников, различающихся объемом заместителей, распределением электронной плотности и редокс-потенциалом, сказывается на региоспецифичности реакции и, следовательно, на структуре и свойствах лигнина. Частота различных типов межмономерных связей в лигнине из древесины ели и березы указана на схеме 2 [14].

Таким образом, лигнин образуется путем статистического взаимодействия низкомолекулярных соединений, а не по матричному механизму, как нуклеиновые кислоты и белки, и не вследствие деятельности набора специфичных конденсирующих ферментов, как это происходит при биосинтезе олигосахаридов и пептидных антибиотиков. Из всего многообразия биополимеров подобный тип биосинтеза присущ, по-видимому, еще лишь меланину.

Будучи неупорядоченным, биосинтез лигнина легко поддается моделированию. Вещество, сходное по структуре и свойствам с природным лигнином (так называемый дегидрополимер — ДГП), образуется при окислении природных фенолоспиртов — предшественников лигнина (или родственных им соединений) перекисью водорода в присутствии пероксидаз [3, 15—17]. ДГП как близкий аналог природного лигнина широко приме-



няется в научных исследованиях, поскольку можно управлять его молекулярной массой и мономерным составом, а также включать в нужные места изотопные метки. Интересно, что часть молекул пероксидазы может оказаться связанной с ДГП, вероятно, благодаря участию тирозиновых остатков в окислительном сочетании [18].

По-видимому, вполне реально создать статистическую модель биосинтеза лигнина, учитывающую реакционную способность, пространственную структуру и конформационные характеристики отдельных мономеров и катион-радикалов (радикалов) (см., например, [12, 19, 20]). Известны, в частности, попытки использовать для этой цели теорию фракталов [19]. Польза от такого рода моделей может быть двойкой. Во-первых, сравнение предсказанного ими распределения типов связей с присущим природному или синтетическому лигнину позволит выявить факторы, контролирующие биосинтез. Во-вторых, имея в виду будущее генной инженерии растений и перспективы утилизации лигнина как одного из основных возобновляемых источников органической материи, быть может, удастся планировать свойства лигнина, в том числе создание в нем «слабых мест». Их присутствие в природном лигнине неизмеримо облегчило бы решение практически всех проблем химической и биохимической переработки древесины.

Поскольку образование целлюлозных фибрилл в растительной ткани опережает ее лигнификацию, эти фибриллы оказываются погруженными в образующийся вокруг них лигниновый матрикс. Именно это обстоятельство определяет прочность древесины, трудность выделения из нее чистой целлюлозы и устойчивость целлюлозы в древесине к действию целлюлазных ферментов. Объединение целлюлозы и лигнина в древесине является не только топологическим. В процессе окислительной конденсации между лигнином и целлюлозой возникают и химические связи — иными словами, образуются смешанные полимеры — лигноцеллюлозы. Полагают, что образование лигноцеллюлоз существенно сказывается на ранних этапах лигнификации, поскольку оно влияет на коллоидные свойства растущей молекулы лигнина [1, 19, 21].

Нерастворимость основной массы лигнина и его тесная связь с целлюлозой крайне затрудняют выделение лигнина из древесины в нативном состоянии. Наиболее щадящие методы получения растворимых фракций основаны на их экстракции из древесины 96% диоксаном (лигнин Бюркмана) или этанолом (лигнин Браунса). Иногда для получения лигнина древесину тщательно обрабатывают целлюлазами. Из таких препаратов также можно выделить растворимые фракции [22].

Среди многих проблем, связанных с изучением лигнина, особое место занимает вопрос о его эволюционном происхождении. По мере накопления кислорода в первичной атмосфере у живых существ возникла необходимость защиты своих тканей от его повреждающего действия. Одним из путей такой защиты был синтез легко окисляющихся веществ, которые брали удар на себя и в то же время являлись ловушками радикалов, возникающих при перекисном окислении других соединений. Представляется привлекательным предположить, что на ранних этапах эволюции высших растений образование лигниноподобных веществ из легко окисляющихся предшественников было всего лишь одной из форм защиты от кислорода. На последующих этапах оказалось, что лигнин полезен растениям как конструкционный материал, что привело к замене одного фактора естественного отбора на другой. Чтобы оценить правомерность этой гипотезы, необходимы дополнительные сведения о присутствии, составе и структуре лигниноподобных веществ в наиболее древних и примитивных растениях.

Сетчатость структуры лигнина, многообразие типов межмономерных единиц и связей между ними делают этот биополимер крайне неудобным объектом для изучения селективных воздействий, химических или ферментативных. К счастью, благодаря слабому взаимодействию между отдельными блоками вполне допустимо исследовать химические свойства лигнина «по частям», используя для этого низкомолекулярные соединения, имитирующие отдельные участки структуры лигнина. Известно большое число таких синтетических моделей лигнина [5, 16, 23], и многочисленные примеры их применения описаны ниже. По большей части (исключением здесь служит вератриловый спирт (8)) они воспроизводят структуру димеров лигниновых предшественников (соединения (9) — (11); ср. схему 2), и это обстоятельство отражает принятая для них номенклатура. Так, например, модель типа β -O-4 (9) — это соединение со скелетом фенилпропана, β -атом боковой цепи которого соединен эфирной связью с 4-положением в ароматическом кольце другого фенилпропана. Заметим, что в каждом из фенилпропановых остатков боковая цепь может быть укорочена или вообще отсутствовать, если это допускается конечными задачами моделирования. Они же определяют положение и природу функциональных групп.

Поскольку все связи в лигнине негидролизуются, единственным способом разрушить его является окисление. В природе лигнин расщепляют лишь некоторые грибы и бактерии, а высшие организмы (напри-

мер, термиты) способны утилизировать его только благодаря своей кишечной микрофлоре [3, 24].

Грибы, разрушающие лигнин, растут на живых или мертвых деревьях. Их различают по типу повреждений древесины как грибы мягкой, коричневой и белой гнили [3, 25].

Грибы мягкой гнили, в частности некоторые аскомицеты, атакуя древесину, вызывают ее размягчение и потерю веса. Разрушаются при этом в основном полисахариды, а лигнин, по-видимому, лишь частично деметилируется.

Грибы коричневой гнили также разрушают главным образом полисахариды. Лигнин в основном тоже деметилируется; кроме того, в нем увеличивается содержание карбонильных и карбоксильных групп, определенное количество которых всегда присутствует в природном лигнине.

Грибы белой гнили, повреждающие все основные компоненты древесины, являются ее наиболее мощными природными деструкторами. Полисахариды и лигнин обычно разрушаются ими одновременно, относительные скорости этих процессов зависят от вида грибов и условий их существования. При атаке лигнина грибами белой гнили 1) уменьшается число метоксильных групп, фенольных и алифатических гидроксильных, 2) расщепляются ароматические ядра с образованием алифатических карбоксилсодержащих остатков, 3) появляются новые карбонильные и карбоксильные группы, 4) образуются алкокси- и феноксисуксусные кислоты и производные феноксиэтанола. Возможна деградация вплоть до конечного продукта окислительных реакций — CO_2 .

К грибам белой гнили относят несколько сот видов базидиомицетов из семейства *Hymenomycetes*, а также некоторые аскомицеты. Наиболее изучен базидиомицет *Phanerochaete chrysosporium*, обладающий особенно высокой лигнолитической активностью. Установлено, что разрушение лигнина у грибов белой гнили сцеплено со способностью подвергать окислительной деградации различные ксенобиотики. Так, *Ph. chrysosporium* окисляет угли [26—28], хлорорганические и полициклические ароматические соединения, в том числе стойкие инсектициды и диоксин [29—41] (о других грибах см. [34, 40, 42]).

Среди микроорганизмов, способных частично окислять лигнин, несколько родов актиномицетов, эубактерий, а также *Mycobacteria* [3, 25, 43, 44]. Поселяясь в древесине, они в основном расщепляют полисахариды. Под действием некоторых бактерий из лигнина в результате деметилирования и разрыва части β -эфирных связей образуется водорастворимый продукт, который осаждается при подкислении [45—49]. Механизмы разрушения лигнина микроорганизмами в настоящее время изучены относительно мало.

Как ни странно, пока неясно, какова физиологическая роль деградации лигнина. По-видимому, только некоторые виды бактерий могут использовать лигнин как единственный источник энергии и углерода и включать в пукленовые кислоты и белки метку из синтетического [^{14}C]лигнина [43]. У прочих организмов, в том числе грибов белой гнили, расщепление лигнина происходит всегда параллельно с использованием обычных субстратов. Данных об участии продуктов деградации лигнина в анаболических процессах у этих организмов нет. По всей видимости, основная цель, с которой бактерии и грибы разрушают лигнин, — сделать целлюлозу в древесине более доступной для действия собственных целлюлаз. Похоже, однако, что они выбирают для этого разные стратегии: одни предпочитают расщеплять лигнин на относительно мелкие фрагменты, другие делают упор на придание ему растворимости.

Биологическое окисление лигнина осуществляется атмосферным кислородом или перекисью водорода через посредство различных ферментов. Эти окислительные ферменты (среди них могут быть оксидазы, оксигеназы

и пероксидазы) изучены пока далеко не достаточно. Кое-что, однако, уже почти несомненно: во-первых, они обычно выделяются клетками в окружающую среду и функционируют автономно (подобно протеиназам в пищеварительном тракте); во-вторых, организм всегда производит не один, а несколько окислительных ферментов (в том числе близкородственных), которые образуют своего рода лигнолитический комплекс.

Пока среди ферментов таких комплексов не обнаружены оксигеназы. Напротив, оксидазы встречаются достаточно часто. Чаще всего речь идет о лакказах — медьсодержащих фенолоксидазах. Лакказы, по-видимому, атакуют главным образом фенольные звенья лигнина, способствуя его конденсации, и лишь в незначительной степени расщепляют в нем С—С и С—О-связи [5, 6]. В присутствии соединений, возможно служащих переносчиками электронов (ремазола синего или 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоната)), лакказа медленно окисляет и нефенольные модели лигнина [50].

Лакказы — не единственные оксидазы в грибных лигнолитических комплексах. Так, например, к ним, по-видимому, не принадлежит фермент — носитель оксидазной активности *Panus tigrinus* [51—54]. С другой стороны, лакказы не являются обязательным компонентом грибных лигнолитических комплексов. Их, в частности, не продуцирует *Ph. chrysosporium*.

Исследователи до сих пор не могут прийти к согласию, какие ферменты лигнолитических комплексов играют ведущую роль в сложном и многоступенчатом процессе деструкции лигнина. В последние годы наибольшее внимание уделяется пероксидазам, экскретируемыми некоторыми грибами белой гнили. И, хотя споры о характере их участия в биодegradации лигнина далеко не закончены, эти ферменты столь своеобразны, что представляют интерес не только для специалистов по химии древесины, но и для широкого круга энзимологов.

2. Лигниназа: биосинтез, выделение, строение и свойства

В 1983—84 гг. две исследовательские группы — Кирка и Голда — практически одновременно выделили из культуральной среды базидиомицета *Phanerochaete chrysosporium* гемсодержащий фермент, который в присутствии перекиси водорода частично деполимеризует метилированный лигнин и окисляет нефенольные модели лигнина [55—58]. Этот фермент называли по-разному: лигнинразрушающий фермент (лигниназа) [55], лигнинразрушающая H_2O_2 -оксигеназа [57] или оксидаза [59], диарилпропаноксигеназа [58], лигнинпероксидаза [60]. Этот ряд отражает эволюцию взглядов на механизм функционирования фермента. После того как было установлено, что он является истинной пероксидазой [61—63], общепотребительными остались два названия — лигнинпероксидаза и лиггиназа.

Вскоре сходная ферментативная активность была обнаружена и у других грибов белой гнили: *Phlebia radiata*, *Panus tigrinus*, *Coriolus versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Bjerkandera adusta* и др. [6]. По мере накопления данных, однако, стало очевидным, что необходимо различать лигнолитическую и «лиггиназную» активности, поскольку многие грибы, эффективно разрушающие лигнин, не продуцируют ферментов, подобных лиггиназе *Ph. chrysosporium*. Поэтому сейчас к лиггиназам относят лишь те из грибных пероксидаз, которые родственны лигнинпероксидазе из *Ph. chrysosporium* и, в частности, подобно ей окисляют вератриловый спирт в вератриловый альдегид. Эта реакция, использовавшаяся как удобный метод опре-

деления активности лигниназы из *Ph. chrysosporium* [57]*, сейчас стала одним из критериев классификации лигнолитических ферментов. Исходя из него, например, среди ферментов *Panus tigrinus* нет лигниназ, хотя этот гриб эффективно разрушает лигнин [51–54]. Чаще всего под лигниназой подразумевают все же лигнинпероксидазу, выделяемую *Ph. chrysosporium*. Именно так следует относиться к этому термину в данном обзоре (если не оговорено иное).

Лигниназам приписывают ведущую роль в разрушении лигнина, по крайней мере теми грибами, которые их продуцируют, однако они, безусловно, не единственные пероксидазы грибов белой гнили. Так, *Ph. chrysosporium* и *Phlebia radiata* наряду с лигниназами выделяют гемсодержащие пероксидазы, способные функционировать только в присутствии Mn^{2+} -ионов [9, 65–68]. Ионы марганца не только необходимы для действия этих пероксидаз, но также стимулируют их биосинтез [69–71]. Сходные пероксидазы обнаружены и у таких грибов, которые не продуцируют лигниназы, в частности у *Panus tigrinus* [51–54] и *Lentinula edodes* [72]. Недавно было показано, что Mn -пероксидазы способны частично деполимеризовать ДГП [73]. По-видимому, сейчас нет оснований сомневаться в том, что эти ферменты совместно с лигнинпероксидазами и лакказами участвуют в разрушении лигнина (см., например, [74]).

Пероксидазы грибных лигнолитических комплексов используют перекись водорода, генерируемую клеточными оксидазами. У *Ph. chrysosporium* существенный вклад вносят глюкоза-1- и глюкоза-2-оксидазы [75–79]. Мутанты, утратившие глюкозооксидазную систему, теряют способность окислять лигнин до CO_2 , между тем как у соответствующих ревертантов она восстанавливается [80, 81]. По-видимому, в генерации H_2O_2 участвуют и другие оксидазы: глиоксальоксидаза [82, 83], ацил- CoA -оксидаза [84], метанолоксидаза [85] (об образовании метанола при деградации лигнина *Ph. chrysosporium* см. [86]).

Хотя лигниназная активность (в узком смысле этого термина) найдена и у других грибов белой гнили (*Trametes (Coriolus) versicolor* [87–89], *Chrysosporium pruinatum* [88], *Phlebia radiata* [90–92]), наиболее изученной лигниназой является фермент из *Ph. chrysosporium*. Быстрому накоплению данных о нем способствует стремление многих исследователей разработать приемлемые биотехнологические методы делигнификации.

Уже многое известно о том, как продуцируется лигниназа при культивации *Ph. chrysosporium*. Деградация лигнина — один из процессов так называемого вторичного метаболизма этого гриба. Условием активации вторичного метаболизма и продуцирования ферментов лигнолитической системы является нехватка в среде обитания источников азота, углерода или серы [60, 93–98]. При культивации *Ph. chrysosporium* наиболее предпочтителен недостаток азота (ситуация, близкая к природной, поскольку грибы растут на бедной азотом древесине). Лигнин не может служить единственным субстратом, и гриб нуждается в других источниках углерода (энергии). В природе ими являются целлюлоза и гемицеллюлоза, а в искусственных условиях обычно используют «обычные» питательные вещества: глюкозу или другие сахара [60, 93, 95, 99, 100]. После активации вторичного метаболизма лигниназная активность появляется лишь

* Стандартная процедура основана на легкости спектрофотометрического определения вератрового альдегида по поглощению при 310 нм ($\epsilon^{310} = 9600 M^{-1}cm^{-1}$). Реакционная смесь обычно содержит 2 мМ вератриловый спирт, 0,4 мМ H_2O_2 и фермент в 0,1 М тартратном буфере, pH 3. За единицу активности принимают способность препарата фермента катализировать образование 1 мкмоль вератрового альдегида в 1 мин [57]. При меньших значениях pH активности лигниназы больше, но она быстро инактивируется. Нельзя инкубировать лигниназу с перекисью водорода в отсутствие субстрата, так как это тоже приводит к инактивации [64].

на 2–3-й день, достигает максимума к 5–6-му дню, после чего постепенно падает. Причина ее уменьшения, по-видимому, в появлении внеклеточных протеиназ (особенно заметном при нехватке углерода [101]), которые могут вызвать не только повреждения внеклеточных белков, но и лизис клеток гриба [95, 101, 102]. Пики протеиназной активности, в отличие от лигниназного, приходится на 2-й и 8-й дни, причем появление второго пика можно предотвратить, если накануне добавить источник углерода: спад лигниназной активности при этом значительно уменьшается [101].

Существенной частью вторичного метаболизма является синтез вератрилового спирта из фенилаланина, синхронный или предшествующий образованию лигниназы [2, 103, 104]. Вератриловый спирт играет важную роль при деградации лигнина. При его добавлении в среду лигниназная активность культуры повышается в несколько раз [60, 97, 99, 105]. Первоначально предполагали, что вератриловый спирт, являющийся субстратом лигниназы, играет роль индуктора ее биосинтеза [104, 106], однако позже было показано, что он не ускоряет ни транскрипцию, ни трансляцию [4]. По-видимому, вератриловый спирт, с одной стороны, служит переносчиком электронов между лигниназой и лигнином [107, 108], а с другой — защищает лигниназу от инактивации эндогенной перекисью водорода [38, 105, 109]. Выход лигниназы при культивации *Ph. chrysosporium* возрастает также в присутствии диметоксибензолов [2], вератриламина [110], гомовератриламина [111] и, наконец, самого лигнина [2].

Еще одна особенность вторичного метаболизма *Ph. chrysosporium* — секретирование грибом наружу гликана, который, как предполагают, способен ингибировать лигниназу [112].

В настоящее время *Ph. chrysosporium* для получения лигниназы выращивают в основном тремя способами: 1) в тонком слое культуральной жидкости без перемешивания (так называемые медкие стационарные культуры); 2) при перемешивании (встряхивании) и 3) в дисковых ферментерах [8]. Первый способ относительно прост и не требует специального оборудования, однако применим лишь в малых масштабах. Увеличение объемов культур и колб не приводит к пропорциональному увеличению выхода лигниназы, вероятно, из-за ухудшения снабжения гриба кислородом. Вообще, скорость деградации лигнина сильно зависит от концентрации кислорода в среде. Кислород, с одной стороны, способствует росту содержания лигниназы (и H_2O_2 -продуцирующих ферментов) [60, 113–115], а с другой — ускоряет катализируемые ею реакции. Перемешивание улучшает снабжение кислородом, однако выращивать гриб при перемешивании в больших объемах сначала не удавалось. В этих условиях мицелий сбивался в комок, из-за чего, по-видимому, подавлялось продуцирование лигниназы [60] и синтез вератрилового спирта [94, 103]. Успех был достигнут с помощью поверхностно-активных веществ, способствующих росту грибов в виде небольших гранул, а также при использовании мутантных штаммов, не сбивающихся в комок [116, 116–122]. В настоящее время разрабатываются методы культивации гриба в танковых ферментерах при перемешивании [123]. При выращивании гриба в дисковых ферментерах используют мутантный штамм, прилипающий к диску [99, 124]. Разработаны также методы выращивания гриба на различных носителях [122, 125–129].

Лигниназная активность сильно зависит от состава среды. Гриб выращивают при pH около 4,5, поддерживаемом, как правило, диметилсульфатным буфером [8] (более дешевы тартратный [124] и ацетатный [130]). Известны оптимальные концентрации микроэлементов (особенно критично содержание Cu и Mn [69, 94, 99, 111]), фосфолипидов и жирных кислот [120, 131, 132]. Очень важно также соблюдение правильного температурного режима [60, 133–135].

Многие из проблем, связанных с культивацией *Ph. chrysosporium*, могут, по-видимому, быть преодолены с помощью мутантных штаммов, у которых синтез лигнолитического комплекса не зависит от содержания в среде источников азота и углерода [136, 137]. Лигнолитическая активность этих штаммов больше, чем «голодающих» культур, поскольку они продуцируют лигниназу в условиях хорошего питания. В последние годы для получения лигниназ все шире привлекается генно-инженерная техника (см., например, [138–141]).

Выделить лигниназу относительно несложно, поскольку она секретруется грибом в культуральную жидкость, отделяемую от мицелия центрифугированием или фильтрованием. Эту жидкость далее концентрируют ультрафильтрацией через мембраны, а затем диализуют для удаления остатка солей и других низкомолекулярных примесей. Заключительный этап — это, как правило, анионообменная хроматография с использованием DEAE-смола [57–59, 142]; часто применяют колонки MonoQ для скоростной жидкостной хроматографии белков (FPLC). Разрешающая способность второго метода значительно больше и позволяет разделить лигниназную фракцию на множество изоформ [99, 143]. В последнее время применяют также препаративное изоэлектрическое фокусирование [144], по своей разрешающей способности даже превосходящее FPLC. Растворы лигниназы далее концентрируют ультрафильтрацией и обессоливают диализом или гель-фильтрацией. При необходимости растворы фермента быстро замораживают в жидком азоте и хранят при -20°C в течение нескольких месяцев [8].

В растворе лигниназа устойчива при 37°C в течение не менее 5 сут, но быстро теряет активность при $50\text{--}60^{\circ}\text{C}$ [135]. Она может быть иммобилизована на различных носителях с помощью бифункциональных реагентов, взаимодействующих с аминок группами фермента (см., например, [145]).

Первое время полагали, что лигниназа из *Ph. chrysosporium* является индивидуальным белком [55, 56]. В дальнейшем, однако, выяснилось, что она представляет собой смесь изоферментов [99, 116, 143, 144, 146, 147], кодируемых разными генами [148–160]. Число обнаруживаемых изоферментов колеблется от 2 до 15 и зависит не только от эффективности метода разделения, но также от природы штамма, условий выращивания и времени, прошедшего после инокуляции [4, 99, 143]. Судя по кинетике тепловой инактивации лигниназы, существует по меньшей мере две группы изоферментов, различающиеся тепловой устойчивостью [135].

Номенклатуры изоферментов лигниназы сложились на основе используемых методов разделения: FPLC или изоэлектрической фокусировки. По первой, более распространенной, изоферментам присваивают номера, отвечающие порядку элюции с колонки, по второй — в соответствии с ве-

Таблица 1

Физические свойства изоферментов лигниназы *Ph. chrysosporium* [143]

Свойства	Изоферменты					
	Н1	Н2	Н6	Н7	Н8	Н10
Молекулярная масса, кДа	38	38	40	42	42	43
<i>pI</i>	4,7	4,4	3,7	—	3,5	3,3
Доля, % *	7	27	11	7	39	9

* Содержание изофермента в лигниназной фракции, выделенной на 6-е сут после инокуляции.

Аминокислотный состав изоферментов лигниназы *Ph. chrysosporium* [144] *

АМИНО- КИСЛОТЫ	Изоферменты (рI)				
	1 (4,65)	2 (4,15)	3 (3,85)	4 (3,80)	5 (3,70)
Ala	41	38	35	38	38
Arg	9	9	10	10	9
Asx	34	39	44	39	44
Cys	5	5	6	6	5
Glx	39	40	45	45	44
Gly	34	38	37	35	37
His	12	11	9	8	8
Ile	21	20	23	27	23
Leu	22	20	22	27	22
Lys	10	11	11	9	8
Met	1	6	2	6	2
Phe	28	30	30	29	31
Pro	37	31	35	31	34
Ser	21	20	22	21	20
Thr	24	22	23	24	19
Tyr	1	0	0	0	0
Всего	359	365	380	380	369

* Содержание триптофана неизвестно.

личиной изоэлектрической точки. Так, из культуральной среды штамма *Ph. chrysosporium* ВКМ-F-1767 с помощью FPLC выделили 10 гемсодержащих пероксидаз, обозначенных Н1–Н10. Из них ферменты Н1, Н2, Н6; Н7, Н8 и Н10, окисляющие вератриловый спирт, являются изоферментами лигниназы, а ферменты Н3, Н4, Н5 и Н10 – Mn-пероксидазами [99, 143]. Изоформа Н6 при электрофорезе в денатурирующих условиях разделилась на две фракции. Определение изоэлектрических точек позволило в данном случае установить некоторое соответствие между двумя типами номенклатур (табл. 1). В целом, однако, результаты, полученные разными исследователями, будет трудно сопоставить до разработки классификации изоформ, основанной на их структуре.

Молекулярные массы изоферментов лигниназы, по данным SDS-электрофореза в полиакриламидном геле, близки: от 38 до 43 кДа [99, 143, 144, 147]. Эти значения достаточно условны, поскольку, будучи гликопротеинами, изоферменты не связывают SDS в той же пропорции к молекулярной массе, как маркерные белки.

Первичная структура изоферментов лигниназы определена клонированием и последующим секвенированием их генов. Пептидные цепи всех изоформ содержат около 370 остатков, включая N-концевые сигнальные пептиды (25–26 остатков гидрофобных аминокислот и разделяющая последовательность Lys-Arg) [149–153, 155–160] (ср. данные для ферментов из *Vjerkandera adusta* [141] и *Trametes versicolor* [161]). Рассчитанная отсюда молекулярная масса (37 кДа) достаточно хорошо согласуется с данными электрофореза, если вспомнить о посттрансляционном гликозилировании.

О высокой степени гомологии изоферментов лигниназы свидетельствует как анализ соответствующих генов [153, 155, 158–160], так и данные об аминокислотном составе (табл. 2) и N-концевых последовательностях [144]. Пептидные карты показывают, что при действии протеиназы V-8 (расщепляющей цепь у глутаминовой и аспарагиновой кислот) из изоферментов лигниназы выщепляются сходные пептиды, из которых че-

тыре больших пептида — общие для всех изоформ [99, 143]. Анализ пептидных карт позволил разделить изоферменты лигниназы на три класса: в первый входят Н1- и Н2-изоформы, во второй — Н6, Н7 и Н8, в третий — Н10-изоформа [143]. По некоторым данным, Н2-изоформа отличается от Н1 лишь наличием остатка манноза-6-фосфата [162]. Есть основания полагать, что по крайней мере в некоторых случаях существует значительная гомология между лигниназами разных грибов белой гнили [141, 155, 161], хотя в целом видовые различия лигниназ изучены пока недостаточно.

О высших структурах изоферментов лигниназы пока судить преждевременно, однако есть некоторые данные об их сходстве. Например, поликлональные антитела, полученные к Н2- и Н8-изоформам, дают перекрестную реакцию со всеми другими изоформами [143]. Здесь можно надеяться на скорый прогресс, поскольку недавно удалось закристаллизовать изофермент Н8 [163].

Углеводный компонент лигниназ составляет в среднем 17% (вес.) [143, 144], исключая изоформу с pI 4,15, у которой он примерно вдвое больше [144]. Когда лигниназы обрабатывали эндогликозидазой-Н [144] или N-гликаназой [143], которые отщепляют от гликопротеинов углеводные остатки, связанные с аспарагином, молекулярная масса, по данным SDS-электрофореза, уменьшалась всего на 1,5–3 кДа [143, 144], а препараты, судя по периодатному тесту, сохраняли связанные углеводы [143]. Это означает, что большая часть углеводных остатков образует с белком O-гликозиды. Все изученные изоформы связываются на колонке с конканавалин-А-сефарозой, что говорит о присутствии остатков α -D-маннозы или α -D-глюкозы [143].

Углеводные цепи, по-видимому, не существенны для каталитической активности. Негликозилированная лигниназа Н8, полученная экспрессией рекомбинантного гена в *E. coli*, имеет такую же активность и стабильность, как изоформа Н8, выделенная из культуральной среды *Ph. chrysosporium* [164]. Пока неизвестно, защищает ли гликозилирование лигниназы от внеклеточных протеиназ. Такой защитный эффект известен для грибной лакказы [165].

Интересно, что спутник лигниназы — Mn-зависимая пероксидаза — обнаруживает с лигниназой много общего. Она также является продуктом вторичного метаболизма *Ph. chrysosporium* [65, 67, 71], имеет близкую молекулярную массу, исходно содержит N-концевой сигнальный пептид (правда, более короткий) и подвергается гликозилированию [166]. Структурные данные свидетельствуют не только о сходстве окружения гема у этих ферментов, но и о значительной степени их гомологии [167, 168]. Как и лигниназа, Mn-зависимая пероксидаза является смесью родственных изоформ, кодируемых семейством генов [71, 158, 166, 168].

Все изоформы лигниназы содержат один протогем на молекулу белка. Природа гема была установлена при изучении гемохромогенного комплекса с пиридином [57, 58].

Спектральные исследования лигниназы позволили сравнить ее с другими гемсодержащими белками: пероксидазой из хрена, хлорпероксидазой, цитохромом P-450, миоглобином. Надо отметить, что спектральные характеристики лигниназы обычно определялись при pH 3,5–4,5 (когда она каталитически активна), а других белков — при pH 6–7.

Судя по спектральным данным, лигниназа принадлежит к гемопротеинам с высокоспиновым железом Fe^{3+} [57, 61, 65, 169]. Полоса Core и другие полосы поглощения в видимой области [57, 65] близки к полосам пероксидазы из хрена и миоглобина (табл. 3). ЭПР-спектр лигниназы (g -фактор 5,83 и 1,99) [169] очень похож на спектр акваметмиоглобина и несколько отличается от спектра пероксидазы из хрена.

Полосы поглощения лигниназы (LP) и Mn-зависимой пероксидазы (MnP) из *Ph. chrysosporium* и пероксидазы из хрена (HRP) [9]

Форма фермента	Максимумы полос, нм			
Ферри-, высокоспиновая LP, pH 4,5 MnP, pH 4,5 HRP, pH 6,0	407	500		632
	406	502		632
	403	500		641
Ферри-, низкоспиновая LP-CN MnP-CN HRP-CN LP-N ₃ MnP-N ₃ HRP-N ₃	423		540	
	421		546	
	422		539	
	418		540	575
	417		542	580
	416		534	565
Ферро- LP MnP HRP	435			556
	433			554
	437			556
Ферро-СО LP-СО MnP-СО HRP-СО	420		535	568
	423		541	570
	423		541	575

Число координационных связей гемового железа в лигниназе зависит от температуры и pH: при pH 6,0 их шесть независимо от температуры, а при pH 4,5 — пять при комнатной температуре и шесть вблизи 0° С. Такая зависимость от температуры свойственна также пероксидазе из хрена и цитохром-с-пероксидазе при нейтральных pH [170, 171].

С азидом и цианидом лигниназа образует комплексы, в которых железо гексакоординировано и находится в низкоспиновом состоянии [58, 65] (лигниназа способна катализировать H₂O₂-окисление азидов с образованием азидильных радикалов, инактивирующих фермент [172]). По своим спектрам эти комплексы сходны с соответствующими комплексами пероксидазы из хрена, но отличаются от комплексов цитохрома Р-450 (табл. 3).

В восстановленной (ферро-) лигниназе железо гема пентакоординировано и находится в высокоспиновом состоянии [61, 169]. Эта форма образует комплекс с СО, имеющий типичный для пероксидаз спектр поглощения (табл. 3). В нем отсутствует пик при 450 нм, характерный для цитохрома Р-450, имеющего в качестве пятого лиганда тиольную группу цистеина.

Спектральное сходство с другими пероксидазами не оставляет сомнений в том, что в лигниназе, как и в этих ферментах, пятым лигандом гемового железа является гистидин (ср. [173, 174]). В активном центре многих пероксидаз находят два гистидиновых и один аргининовый остаток. Проксимальный гистидиновый остаток служит аксильным лигандом гемового железа, а дистальный, как полагают, совместно с аргининовым участвует в стабилизации заряда при расщеплении перекиси водорода [173, 175—179]. В лигниназе также обнаружены сходным образом расположенные в цепи все эти три аминокислотных остатка: проксимальный гистидин (His-176), дистальный гистидин (His-47) и

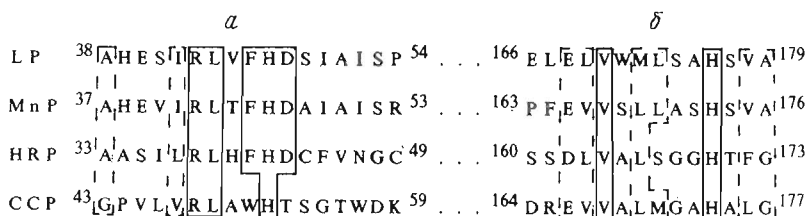


Рис. 1. Гомология в области активного центра у лигниназы (LP), Mn-зависимой пероксидазы (MnP) (обе из *Ph. chrysosporium*), пероксидазы из хрена (HRP) и цитохром-с пероксидазы (CCP). Идентичные остатки обрaмлены сплошной, а сходные — штриховой линией [149, 166]. a — проксимальный гистидин, б — дистальный гистидин

аргинин (Arg-43) (рис. 1) [149—153]. Их принадлежность к активному центру подтверждается при изучении лигниназы с помощью ЯМР-спектроскопии [180]. (О структурной гомологии лигниназы и других гемсодержащих пероксидаз см. [181].)

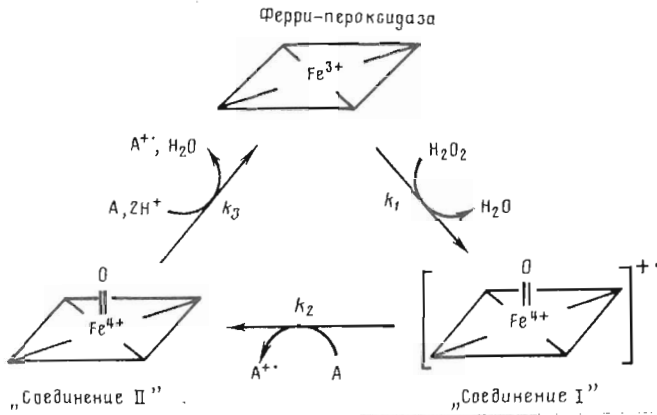
3. Механизм действия лигниназы

Выше отмечалось, что окислительными косубстратами лигниназы вначале считали кислород и перекись водорода. Действительно, для функционирования лигниназы необходима перекись водорода и вместе с тем в присутствии кислорода иногда не только появляются новые продукты деградации, но его атомы включаются в эти продукты [5, 57, 182]. Истинная роль перекиси водорода и кислорода была выяснена в последующих экспериментах. Во-первых, оказалось, что окисление синтетических моделей лигнина может происходить анаэробно, когда перекись является единственным окислителем [62, 64, 183]. Во-вторых, было достоверно показано, что при этом генерируются свободные катион-радикалы субстрата и их образование, по-видимому, не зависит от присутствия кислорода [62, 184, 185]. Эти факты легли в основу предложенного в 1985 г. несколькими группами исследователей пероксидазного механизма лигниназного катализа [62, 184—186]. В соответствии с ним катализируемое лигниназой окисление лигнина и родственных ему соединений включает следующие элементарные реакции:

- 1) окисление лигниназы перекисью водорода,
- 2) одноэлектронное окисление субстрата окисленными формами фермента с образованием субстратного катион-радикала,
- 3) депротонирование и/или фрагментация катион-радикала, приводящие к дочерним радикалам,
- 4) одноэлектронное окисление дочерних радикалов окисленными формами фермента,
- 5) окисление дочерних радикалов кислородом с промежуточным образованием гидроперекисей.

Таким образом, участие кислорода предполагается лишь на заключительной стадии окисления субстрата, причем эта окислительная реакция альтернативна одной из стадий ферментативного окисления.

Анализ стационарной кинетики лигниназного окисления вератрилового спирта показал, что эта реакция протекает по обычному для пероксидаз «пинг-понг»-механизму, согласно которому реакция фермента с одним из субстратов (H_2O_2) приводит к образованию окисленной формы фермента, которая, в свою очередь, взаимодействует со вторым субстратом (вератриловым спиртом). Стехиометрия окисления в данном случае проста — $1 \pm 0,05$ моль H_2O_2 на моль вератрилового спирта [64].



Каталитический цикл гемсодержащих пероксидаз [173, 174]

Как известно, каталитический цикл гемсодержащих пероксидаз включает следующие этапы (схема 3) [173, 174, 176]:

1. Ферри-фермент подвергается двухэлектронному окислению перекисью водорода, превращаясь в так называемое «Соединение I».
2. «Соединение I» производит одноэлектронное окисление субстрата, восстанавливаясь в форму, называемую «Соединением II».
3. «Соединение II» производит еще одно одноэлектронное окисление субстрата, восстанавливаясь в исходный ферри-фермент.

Интермедиаты типа «Соединения I» и «Соединения II» участвуют и в каталитическом цикле лигниназы, который, однако, обладает некоторыми специфическими особенностями.

Когда лигниназа окисляется перекисью водорода в «Соединение I», ее полоса Сорс (как и других пероксидаз) уменьшается и претерпевает гипсохромный сдвиг [187—189] (см. табл. 4). Реакция завершается за 100—200 мс (константа скорости второго порядка около $5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$) [187, 188, 190], т. е. она примерно в 100 раз медленнее, чем у других пероксидаз [173, 174, 176]. Энергия активации этой реакции (5,9 ккал/моль [190]) несколько больше, чем у пероксидазы из хрена (3,5 ккал/моль [191]).

«Соединение I» образуется также при окислении лигниназы органическими перекисями (надуксусной и *m*-хлорнадбензойной кислотами,

Таблица 4

Полосы поглощения в спектрах окисленных форм лигниназы *Ph. chrysosporium* (LP) [189, 190] и пероксидазы из хрена (HRP) [173, 174]

Фермент	Максимумы, нм		
	«Соединение I»	«Соединение II»	«Соединение III»
LP	408, 550, 608, 650	420, 525, 556	414(419*), 543, 578
HRP	400, 557, 622, 650	420, 527, 554	413, 546, 583

* «Соединение III».

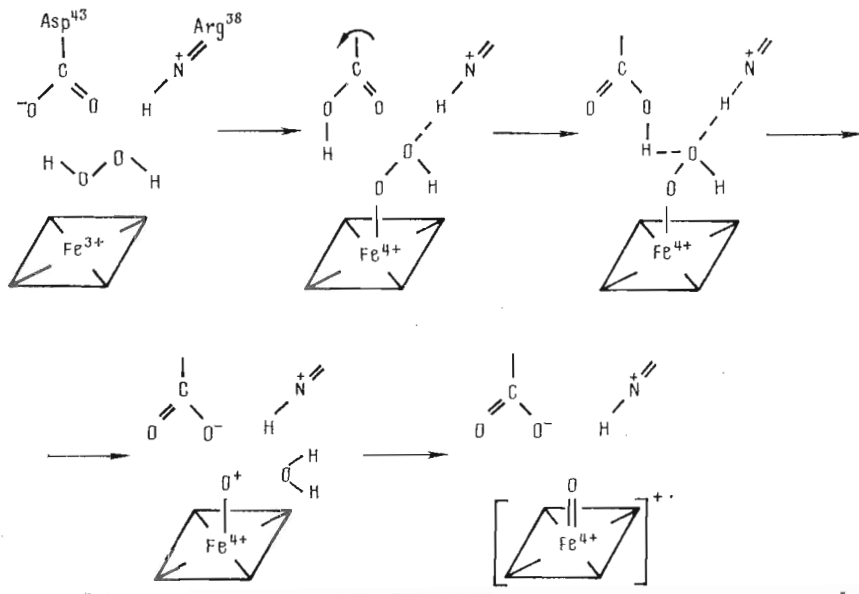


Рис. 2. Гетеролитическое расщепление перекиси водорода в активном центре пероксидазы из хрена [174]

этил- и *трет*-бутилгидроперекисями), однако гораздо медленнее, чем при окислении перекисью водорода [190]. По-видимому, для этих объемистых окислителей в лигниназе гем менее доступен, чем в пероксидазе из хрена, которая окисляется *m*-хлорнадбензойной кислотой быстрее, чем H_2O_2 [192]. Эта особенность лигниназы позволяет думать, что органические перекиси, образующиеся при присоединении кислорода к радикалам субстрата, не участвуют в окислении фермента.

Обычно скорость образования «Соединения I» у пероксидаз падает с уменьшением pH ниже 4–5. Это принято объяснять тем, что в расщеплении перекиси водорода участвует депротонированная группа с $pK_a < 5$ — предположительно карбоксил аспарагиновой кислоты или имидазольное ядро дистального гистидина (рис. 2) [173–176, 193–195]. Между тем, судя по спектральным данным, скорость образования «Соединения I» из лигниназы не зависит от pH в интервале $2 < pH < 7,5$ [64, 187, 188, 190], даже в присутствии нитратов (у многих пероксидаз pH-зависимость при этом смещается в сторону больших pH [176, 194]). Судя по данным, полученным в растворах NaCl, pK_a соответствующей группы в лигниназе крайне низок (≤ 1) [196]. Предполагают, что она представляет собой карбоксилат, образующий ионную пару с протонированной аминогруппой.

Итак, лигниназа окисляется перекисью водорода и переходит при этом в форму, которая по своим свойствам подобна «Соединению I», образуемому другими гемсодержащими пероксидазами. Кинетические характеристики этой реакции отличаются некоторым своеобразием, но в любом случае она протекает слишком быстро, чтобы определять скорость окисления лигниноподобных субстратов.

Что касается «Соединения II», то его образование в каталитическом цикле лигниназы уверенно регистрируется при нейтральных pH при окислении таких субстратов, как вератриловый спирт, ферроцианид или *m*-крезол [187, 188, 190]. Эта окисленная форма лигниназы, как и «Соединение I», по своим спектральным свойствам подобна соответ-

вующей форме других пероксидаз (табл. 4). Скорость окисления субстратов «Соединением II» в этих условиях не превышает скорости их окисления «Соединением I» (для вератрилового спирта $k_2=4,1 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ при pH 7,39 и $k_3=2,3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ при pH 5,16 [178]); благодаря этому стационарная концентрация «Соединения II» достаточна для его обнаружения.

В кислой среде, где лигниназа активнее, идентификация «Соединения II» как интермедиата каталитического цикла не всегда столь проста. Так, судя по спектральным измерениям Маркеса и сотр. [187], «Соединение II» при pH 3,06 удается наблюдать при окислении *n*-крезола и вератрилового спирта (для последнего $k_2=2,5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_3=1,6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Напротив, при окислении в сходных условиях вератрилового спирта Харви и сотр. [188] не удалось однозначно доказать образование «Соединения II», хотя его стационарная концентрация была достаточно высока при окислении ферроцианида.

Вопрос о форме участия «Соединения II» в каталитическом цикле имеет важное значение для понимания механизма лигниназной активности. В рамках общей схемы пероксидазного катализа возможны различные ситуации, определяющие характер наблюдаемых реакций.

1. Продукт окисления субстрата «Соединением I» успевает окислиться вторично «Соединением II» раньше, чем он покинет фермент. Это возможно, если продукт первичного окисления прочно связан и/или достаточна велика скорость его окисления «Соединением II». Внешне такая реакция будет выглядеть как двухэлектронное окисление (ср. [173, 174]).

2. Продукт окисления субстрата «Соединением I» покидает фермент раньше, чем он будет окислен вторично. В этом случае «Соединение I» и «Соединение II» функционируют как независимые окислители, а радикальные продукты окисления попадают в окружающую среду.

3. Продукт первичного окисления субстрата остается связанным с «Соединением II», причем редокс-потенциал последнего при этом повышается. Благодаря этому увеличивается скорость окисления «Соединением II» другой молекулы субстрата [188].

Все эти три модели привлекались для объяснения тех или иных особенностей лигниназного катализа. Заметим, что они, вообще говоря, не являются альтернативными, поскольку каждая может оказаться реальной применительно к определенным условиям и субстратам.

Прежде всего в рамках чисто пероксидазного механизма участие молекулярного кислорода рассматривается как результат по меньшей мере частичного выхода первичных катион-радикалов или дочерних радикалов из активного центра после окисления субстрата «Соединением I». Включение кислорода в продукты окисления наблюдается даже при окислении вератрилового спирта [182], хотя в этом случае прямыми методами обнаружить присутствие свободных радикальных частиц удается не всегда [64] (см., однако, [197]). В других случаях, например при окислении метоксизамещенных бензолов, появление свободных катион-радикалов не вызывает сомнений [184]. Таким образом, пока нет оснований считать, что первая из приведенных выше моделей типична для лигниназного окисления.

При лигниназном окислении низкомолекулярных субстратов выход в окружающую среду относительно устойчивых катион-радикалов и радикалов делает возможным их функционирование в качестве переносчиков электрона. Именно так многие исследователи объясняли ускорение окисления как самого лигнина, так и родственных ему соединений, которое происходит в присутствии вератрилового спирта или диметоксибензолов [60, 97, 99, 107, 198, 199]. Особенно убедительные данные

о возможности такого рода переноса электронов от субстрата к ферменту получены при окислении веществ, которые сами по себе не являются субстратами лигниназы [200–202]. Так, лигниназа в присутствии вератрилового спирта приобретает способность окислять оксалат в анион-радикал $\text{CO}_2^{\cdot-}$ [200, 202]. Как и следует ожидать, в присутствии оксалата неконкурентно подавляется окисление самого вератрилового спирта в вератриловый альдегид [202]. Вместе с тем участие вератрилового спирта в переносе электронов между лигнином и лигниназами пока не доказано (ср. [145]).

Функционирование вератрилового спирта в качестве переносчика электронов не является единственно возможным объяснением его способности ускорять лигниназное окисление. Харви и сотр. предположили, в частности, что этот эффект можно истолковать как свидетельство в пользу третьей из приведенных выше кинетических моделей. Более обоснованы экспериментально, однако, два других предположения о механизме ускорения: предотвращение образования каталитически неактивной формы фермента и/или быстрая регенерация из нее активной формы. Дело в том, что у лигниназы, как и у других гемсодержащих пероксидаз, кроме «Соединения I» и «Соединения II» существует еще одна окисленная форма — «Соединение III», которая не участвует непосредственно в каталитическом цикле [203–206]. По данным КД- и ЭПР-спектроскопии «Соединение III» представляет собой комплекс ферри-гема и супероксидного радикала ($\text{Fe}^{3+}-\text{O}_2^{\cdot-}$) [207].

Известны три пути образования «Соединения III»: 1) присоединение супероксидного радикала к ферри-пероксидазе; 2) присоединение молекулы O_2 к ферро-пероксидазе (поэтому «Соединение III» иногда называют оксикомплексом) и 3) окисление «Соединения II» избытком перекиси водорода [174, 176]. Последняя из этих реакций важна для понимания особенностей лигниназного катализа, поскольку вклад ее может быть значителен в кислой среде [203]. Реакция «Соединение II» + H_2O_2 → «Соединение III» вблизи от pH-оптимума каталитической активности лигниназы (pH 3) протекает примерно в 500 раз быстрее, чем у пероксидазы из хрена (pH 7) [203] (ср. [208]). Скорость этого превращения у лигниназы всего в 15 раз меньше скорости, с которой «Соединение II» окисляет вератриловый спирт [187, 203]. Иными словами, образование «Соединения III» из «Соединения II» конкурентно восстановлению «Соединения II», т. е. реакции, входящей в каталитический цикл. Поскольку «Соединение III» в цикле не участвует, а его превращение в активные формы протекает медленно, образование «Соединения III» по существу означает ингибирование фермента.

Накопление «Соединения III» будет тем меньшим, чем выше концентрация субстратов, окисляемых «Соединением II». Именно поэтому такие соединения, как вератриловый спирт и диметоксибензолы, будучи введенными в среду, могут препятствовать инактивации лигниназы при окислении других субстратов. В стационарных условиях это легко принять за активацию фермента. Ясно, что вклад этого эффекта будет особенно заметен на фоне медленно окисляющихся субстратов, например анисового спирта и других монометоксизамещенных моделей лигнина [109] (ср. [107]).

Роль, которую «Соединение III» играет в лигниназном окислении, вызывает необходимость тщательно изучить его свойства и превращения. Прежде всего желательно выяснить, свойственно ли лигниназе особенно легкое превращение «Соединения II» в «Соединение III», или же все дело только в условиях измерений, поскольку скорость этой реакции у пероксидаз увеличивается с уменьшением pH [203, 208]. Ответа на этот вопрос пока нет. Известно только, что в отличие от пероксидазы

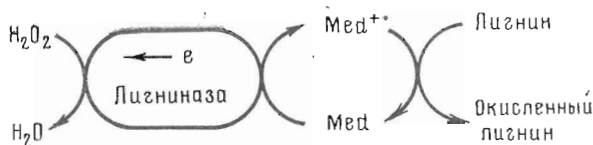
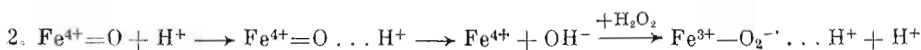
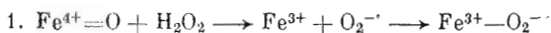


Рис. 3. Участие редокс-переносчика (Med) в энзиматическом окислении лигнина [107]

из хрена [208] образование «Соединения III» у лигниназы совершенно не ингибируется ловушками супероксидных радикалов [205]. Иными словами, из двух приведенных ниже механизмов этой реакции более вероятен второй, исключая промежуточное образование $O_2^{\cdot-}$.



Другая проблема заключается в том, насколько необратимо превращение лигниназы в «Соединение III» и каковы те условия и факторы, которые способствуют возвращению фермента в каталитический цикл. Известно, что после удаления избытка H_2O_2 «Соединение III» медленно отщепляет $O_2^{\cdot-}$, превращаясь в исходную ферри-лигниназу ($k = 1.4 \cdot 10^{-3} M^{-1}c^{-1}$) [205]. Напротив, в присутствии избытка H_2O_2 образуется охарактеризованное лишь спектрально «Соединение III*» ($k = 3 \cdot 10^2 M^{-1}c^{-1}$), дальнейшие превращения которого сопряжены с необратимой инактивацией фермента [203, 205] (см. также [209]). Если же избыток H_2O_2 своевременно удалить, «Соединение III*» медленно превращается в «Соединение III» ($k = 6,6 \cdot 10 c^{-1}$) [203]. Таким образом, в условиях реакции спонтанным возвращением лигниназы из «Соединения III» в одну из форм каталитического цикла, по-видимому, можно пренебречь.

В то же время, согласно данным Вариши и сотр., превращение «Соединения III*» (но не «Соединения III») в ферри-лигниназу значительно ускоряется в присутствии вератрилового спирта ($k = 35 M^{-1}c^{-1}$) [203, 205]. Авторы полагают, что при этом вератриловый спирт не окисляется, однако весьма возможно, что этот вывод ошибочен. Дело в том, что они пытались обнаружить продукт окисления — вератровый альдегид — в присутствии цианида, с которым он образует циангидрин.

Итак, низкомолекулярные субстраты типа вератрилового спирта или диметоксибензолов могут по меньшей мере тремя способами влиять на каталитическую активность лигниназы:

- 1) функционируя в качестве переносчиков электронов,
- 2) препятствуя превращению «Соединения II» в «Соединение III» (и, следовательно, в «Соединение III*»),
- 3) ускоряя превращение «Соединения III*» в ферри-лигниназу.

Выше отмечалось, что вератриловый спирт является продуктом вторичного метаболизма *Ph. chrysosporium*; поэтому ему приписывают функцию эндогенного переносчика электронов между лигнином и лигниназой [107, 108] (рис. 3). Прямых доказательств тому пока нет. Однако нельзя не заметить, что такого рода низкомолекулярные медиаторы были бы здесь крайне уместны, чтобы эффективно окислять те звенья лигнина, которые спрятаны в глубине макромолекулы — своего рода молекулярного сита, непроницаемого для белков. Интересно, что спутник лигниназы — Mn-зависимая пероксидаза устроена таким образом, что участие медиатора в переносе электронов от субстрата к гему — неотъемлемая часть механизма окисления. У этой пероксидазы «Соединение II» в отличие от «Соединения I» может восстанавливаться не суб-

стратом, а исключительно ионами Mn^{2+} . Образующиеся при этом ионы Mn^{3+} (редокс-потенциал около 1,5 В) окисляют субстраты уже независимо от фермента [9, 210]. Нельзя исключить, что, используя этот механизм, Mn-зависимая пероксидаза принимает участие в окислении внутренних звеньев лигнина (ср. [107, 108, 211]).

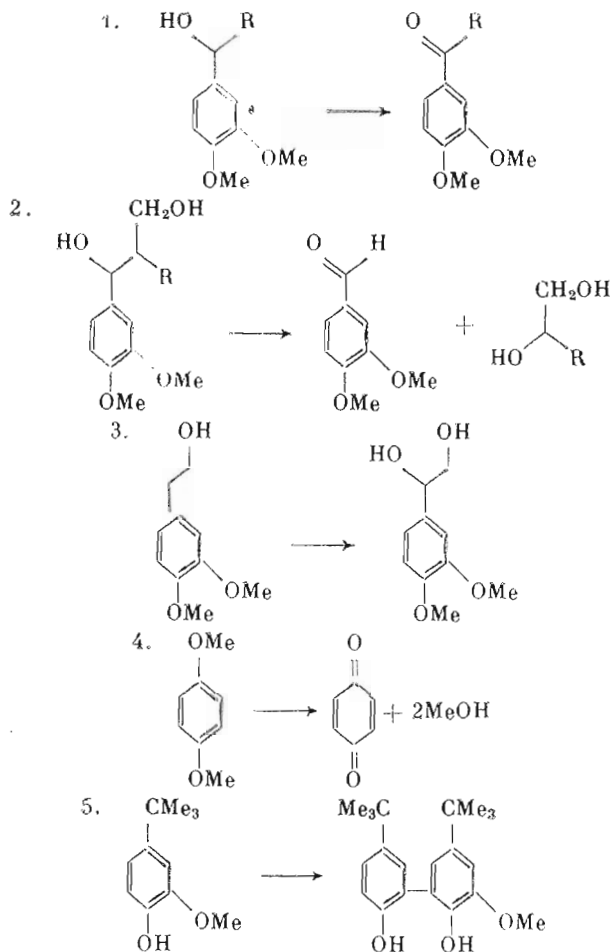
Подобно другим пероксидазам лигниназа катализирует окисление перекисью водорода самых разнообразных веществ. Среди них не только лигнины [55, 212—214], продукты их переработки (см., например, [215]) и нефенольные модели лигнина (обычно производные диметоксифенилкарбинола) [2—5, 9], но также алкоксибензолы [184, 216], фенолы [57, 67, 217, 218] (ср. [219]), полициклические и гетероциклические ароматические соединения [38, 39, 220], ферроцианид [187, 188] и т. д. Пока нет никаких оснований приписывать ей какую-либо структурную специфичность к лигниноподобным соединениям, по крайней мере на стадии первичного одноэлектронного окисления.

Похоже, что возможность окисления определяется только редокс-потенциалами фермента и субстрата. Керстен и сотр. [216] на примере метоксипроизводных бензола показали, что лигниназа является более сильным окислителем, чем пероксидаза из хрена (ср. [221]; аналогичны результаты сравнения лигниназы с Mn-пероксидазой [211]). Это различие, однако, не столь велико, чтобы его можно было рассматривать как принципиальное, поскольку и пероксидаза из хрена, и лактопероксидаза подобно лигниназе в кислой среде катализируют, хотя довольно слабо, H_2O_2 -окисление вератрилового спирта и других лигниноподобных веществ [222]*. Таким образом, с этой точки зрения проблема заключается в том, чтобы, с одной стороны, понять, в силу каких обстоятельств именно у лигниназы несколько выше редокс-потенциал окисленных форм, а с другой — выяснить, почему каталитическая активность многих пероксидаз возрастает с уменьшением pH — факт, ранее не привлекавший особого внимания исследователей. Остается пока открытым также вопрос, отличается ли лигниназа от других гемсодержащих пероксидаз по способности контролировать скорость и направление вторичных реакций субстратных катион-радикалов.

Уровень современных знаний не позволяет установить связь между редокс-потенциалом и структурными особенностями гемсодержащих пероксидаз. Можно лишь предполагать, что определенный вклад здесь вносят геометрия и напряжение связи гемного железа с внешним лигандом — имидазольным остатком гистидина, а также влияние водородной связи между этим остатком и одной из соседних карбоксильных групп (ср. [226]).

Чрезвычайно интересна вторая проблема — pH-зависимость активности пероксидаз. Ясно, что определять такого рода зависимость при сравнительном изучении пероксидаз желательнее, используя такие субстраты, концентрация окисляемых форм которых не зависит от pH, например ферроцианид. Известно, что скорость окисления ферроцианида лигниназой [188], миелопероксидазой и пероксидазой из хрена [173, 174] возрастает с уменьшением pH. Точно так же с уменьшением pH возрастает скорость окисления перекисью водорода вератрилового спирта в присутствии лигниназы [64], пероксидазы из хрена и лактопероксидазы [222]. Этот рост наблюдается вплоть до очень низких pH (около 2),

* Mn-пероксидаза из *Ph. chrysosporium* и пероксидаза из хрена эффективно окисляют вератриловый спирт и некоторые другие модели лигнина в присутствии Mn-ионов и тиолов [223—225]. Есть убедительные доказательства того, что в этих реакциях субстраты окисляются не непосредственно ферментом, а образующимися с его участием тинльными радикалами.



Примеры превращений лигниноподобных соединений при лигниназном окислении

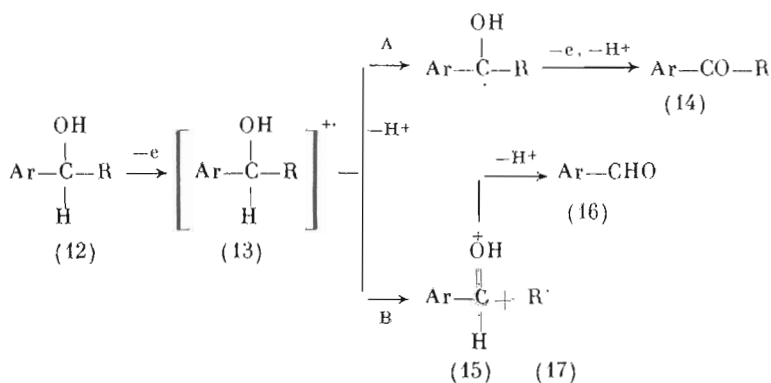
когда измерения становятся затруднительными из-за быстрой кислотной денатурации ферментов. Учет вклада денатурации весьма не прост, и это заставляет с осторожностью относиться к выводам о существовании максимума активности лигниназы при pH около 2 [64]. Пока неизвестно, какая диссоциирующая группа (группы) ответственна за влияние pH, и обусловлено ли оно увеличением редокс-потенциала окисленных форм фермента или какими-то другими факторами. Строго говоря, нельзя даже утверждать, что рост каталитической активности с уменьшением pH и при pH 7 и при pH 3 обусловлен изменением степени диссоциации одной и той же группы. Нельзя исключить, что в сильно кислой среде функционируют необычные окисленные формы фермента, в которых протонирован либо проксимальный имидазольный лиганд гема, либо (что особенно интересно) оксиферрильный кислород самого гема. В этом гипотетическом случае величина pK_a , вероятно, меньше нуля, и реальная концентрация таких «суперактивных» форм чрезвычайно мала (ср. [173, 174]).

4. Химия лигниназного окисления

Превращения субстрата в рамках пероксидазного механизма начинаются с его одноэлектронного окисления, приводящего к катион-радикалу. Поэтому при рассмотрении химических аспектов лигниназного окисления ключевыми являются два вопроса: к каким трансформациям способны катион-радикалы лигнина и родственных ему соединений и в какой мере эти трансформации зависят от свойств фермента. На схеме 4 представлены наиболее типичные примеры превращений синтетических моделей лигнина, окисляемых H_2O_2 в присутствии лигниназы.

Большая часть этих реакций (примеры 1–3) рационально интерпретируется на основе схемы, предложенной Шумейкером для описания превращений катион-радикалов фенолкарбинолов (12) (схема 5) [186] (см. также [227]). Такие катион-радикалы (13) либо отщепляют протон и подвергаются повторному одноэлектронному окислению в кетоны или альдегиды (14) (путь А), либо распадаются на фрагменты с разрывом $C^\alpha-C^\beta$ -связи (путь В). Один из этих фрагментов представляет собой катион (15), теряющий далее протон и превращающийся в нейтральную молекулу (16), а другой — радикал (17), который окисляется ферментом или атмосферным кислородом. Соотношение вкладов этих альтернатив-

Схема 5

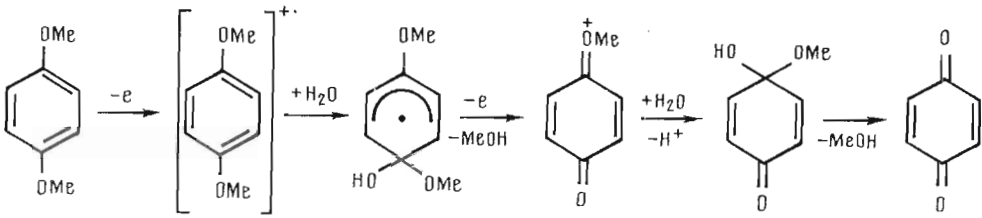


Пероксидазное окисление арилкарбинолов [186]

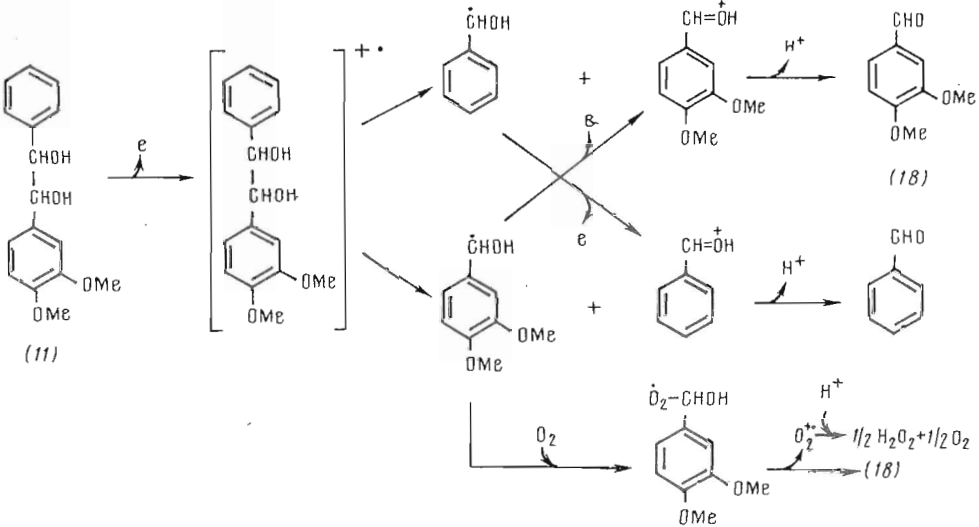
ных путей зависит от прочности $C^\alpha-C^\beta$ -связи в первичном катион-радикале. У первичных фенолкарбинолов (в частности, у вератрилового спирта) оба пути, естественно, совпадают.

Для окислительно-гидролитического деметилирования (см. пример 4 на схеме 4) ключевой стадией, по-видимому, является атака воды на катион-радикал [184, 216] (схема 6). Об участии воды в этой реакции свидетельствует включение кислородной метки в хинон при проведении реакции в среде $H_2^{18}O$ [216]. Последняя, пятая из реакций, приведенных на схеме 4, представляет собой уже рассмотренное выше окислительное сочетание фенолов при их окислении перекисью водорода, которое катализируется многими пероксидазами [57, 67, 217, 218].

Рассмотрим более детально, как протекает лигниназное окисление некоторых соединений, используемых как модели лигнина. Большая часть этих соединений представляет собой α -замещенные 3,4-диметоксифенолкарбинолы. Окисление модели типа β -1 — 3,4-диметоксигидробензойна (11) — приводит к эквимольным количествам бензойного и вератрилового альдегидов. Хэмел и сотр. [62] с помощью спиновых ловушек (2-метил-2-нитропропана и 5,5-диметил-1-пирролин-N-оксида) показали, что в этой реакции участвуют α -гидроксбензильные, а в аэробных



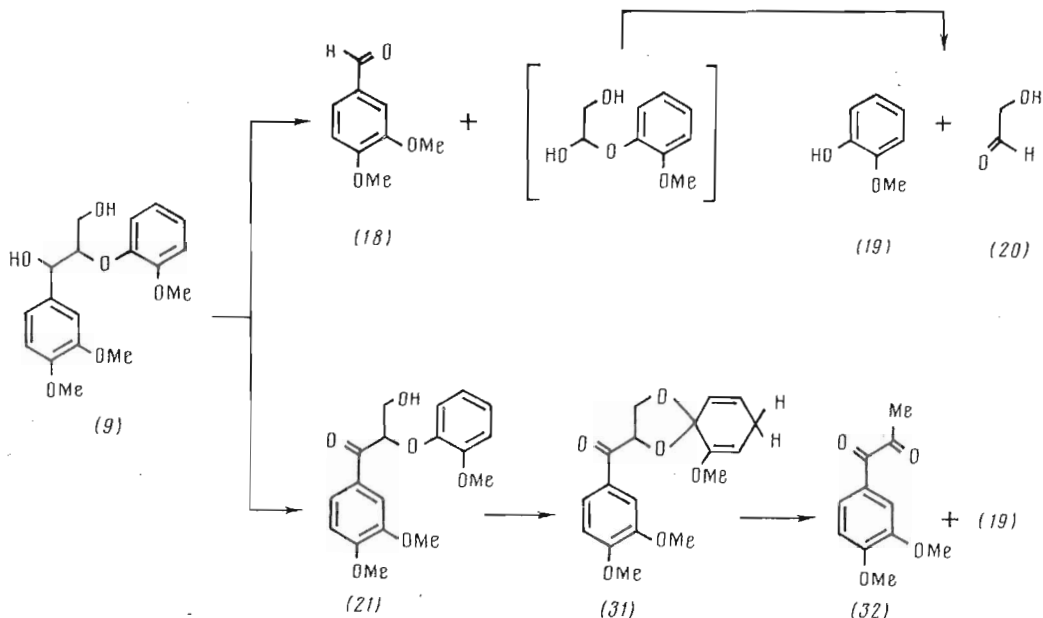
Окислительно-гидролитическое деметилирование 1,4-диметоксибензола



Механизм окисления 3,4-диметоксигидробензоина [62]

условиях — также α -гидроксибензилпероксильные радикалы. Исходя из этого, они предположили, что в данном случае совокупность протекающих процессов может быть описана схемой 7. Отщеплением супероксида от α -гидроксибензилпероксильных радикалов и его последующим диспропорционированием авторы объясняют, почему в аэробных условиях расходится менее 1 моль H_2O_2 на 1 моль субстрата (об участии Mn^{2+} -ионов в генерации H_2O_2 из супероксида см. [113]).

Значительно сложнее протекает окисление соединения (9), принадлежащего к классу β -O-4-моделей [228–235] (см. также обзоры [2, 5]). В молекуле этого субстрата присутствуют два несопряженных диалкоксифенильных остатка, которые могут окисляться лигниназой независимо. Если реакция начинается с одноэлектронного окисления диметоксифенильной части молекулы, происходит либо $C^\alpha-C^\beta$ -фрагментация первичного катион-радикала, приводящая к вератровому альдегиду (18) и продуктам (19), (20), либо его депротонирование и повторное окисление дочернего радикала в кетон (21) (схема 8). Если же реакция начинается с одноэлектронного окисления метоксифеноксильного фрагмента молекулы, то происходит гидролитическое расщепление C—O-связей в катион-радикале (в частности, ведущее к соединению (22)) или внут-



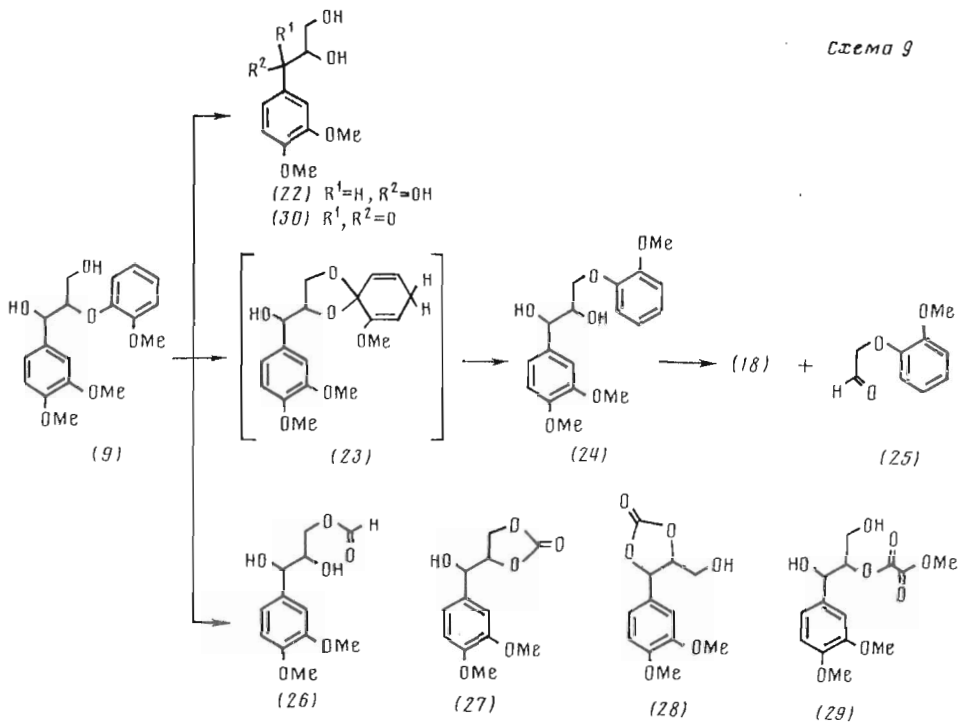
Лигниназное окисление модели лигнина типа β -O-4 в аэробных условиях. Основные реакции с разрывом C-C-связей [6]

римолекулярная атака γ -гидроксильной группы с образованием промежуточного кетала (23) (схема 9). Реальность этого интермедиата следует из присутствия среди продуктов реакции соединений (24) и (25). В сложной смеси продуктов аэробной реакции обнаруживают также соединения (26)–(29), возникающие в результате окислительной деструкции C_6 -кольца. По-видимому, предпосылкой такого рода деструкции является образование радикалов, в которых это кольцо утратило ароматический характер [212, 234–236].

Выше шла речь только о превращениях первичных катион-радикалов соединения (9). Ясно, однако, что сходным образом будут окисляться и продукты его превращений. Различные комбинации окислительных реакций приводят к образованию соединений (30)–(32).

Модели типа β -O-4 имитируют наиболее распространенный в лигнинах тип димерных фенилпропановых блоков. В этой связи представляют интерес данные о заметном различии в скорости лигниназного окисления *эритро*- и *трео*-изомеров 1-(3,4-диметоксифенил)-2-(2,6-диметоксифенокси)-1,3-пропандиола – метоксипроизводного соединения (9). Такое же различие наблюдается и при химическом окислении этих изомеров аммоний-церий(IV)-нитратом [237]. Отсюда следует, что этот эффект обусловлен электронно-конформационными особенностями изомеров скорее, чем разницей в их взаимодействии с ферментом.

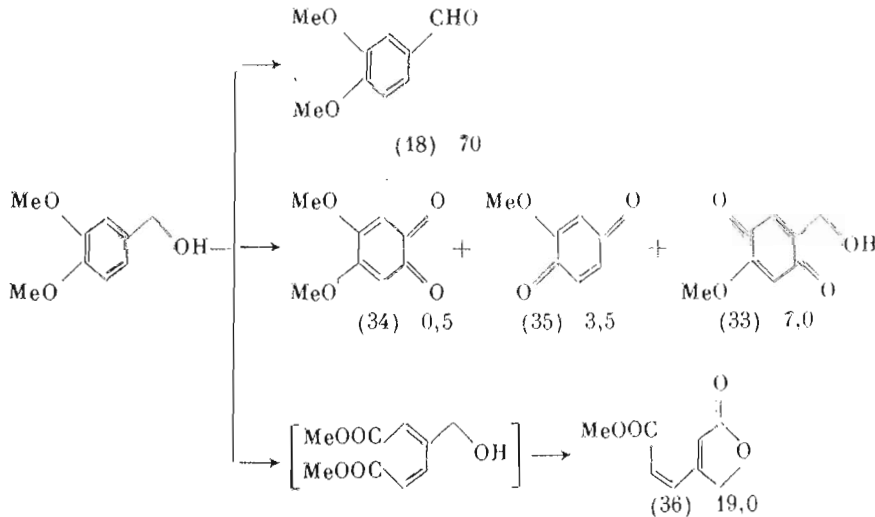
Гидрокселирование и разрушение ароматического кольца в аэробных условиях происходит и у вератрилового спирта [182] (схема 10). В отсутствие кислорода единственным продуктом лигниназного окисления является вератровый альдегид (18). В присутствии же кислорода кроме него образуются хинон (33) – продукт окисления деметилированного первичного катион-радикала, хиноны (34) и (35), возникающие при



Лигниназное окисление модели лигнина типа β -O-4 в аэробных условиях. Основные реакции с разрывом C-O-связей [6]

отщеплении гидроксиметильной группы, и лактон (36) — продукт окислительной деструкции ароматического кольца (ср. [236]).

Уже рассмотренные выше примеры показывают, что катион-радикалам лигниноподобных веществ свойственна множественность возможных пре-



Лигниназное окисление вератрилового спирта в аэробных условиях. Указан выход в процентах [182]

вращений. Выбор между альтернативными направлениями зависит от прочности $C^{\alpha}-C^{\beta}$ -связи (фрагментация), доступности для атаки воды (гидролитического деметилирование), вероятности одноэлектронного окисления дочернего радикала (образование кетонов и альдегидов без фрагментации). Ясно, что фермент как катализатор, во взаимодействии с которым возникают субстратные катион-радикалы, в принципе способен контролировать эти факторы для связанных интермедиатов и тем самым влиять на направление процесса. Существуют по меньшей мере два подхода к тому, чтобы оценить такого рода эффекты: сравнение ферментативной реакции со сходной по механизму химической и сравнительное изучение реакций, катализируемых сходными ферментами. Оба эти подхода могут быть рационально использованы в случае лигниназы.

Известно довольно много работ, авторы которых подвергали лигниноподобные соединения действию одноэлектронных окислителей: аммоний-церий(IV)-нитрата [63], окисленных форм железопорфиринов [238–241], персульфата [242] и др. [63, 243]. Обычно при этом наблюдали образование тех же продуктов, что и при лигниназном окислении. В некоторых случаях опубликованные данные позволяют судить не только об ассортименте, но и о соотношении выходов образующихся веществ. Так, при окислении в водной среде вератрилового спирта кислотой Каро в присутствии железопорфирина основным продуктом реакции был хинон (33) (см. схему 10) (70%), а не вератровый альдегид (18) (20%) [243]. Сходное соотношение выходов хинонов и вератрового альдегида имело место и при окислении соединения (9). Поскольку хиноны возникают как результат окисления продуктов гидролитического деметилирования катион-радикалов, эти результаты позволяют предположить, что при ферментативном окислении по сравнению с химическим гидролиз первичного катион-радикала протекает с меньшей вероятностью.

Влияние структуры свободного катион-радикала на характер его вторичных реакций удалось проследить при изучении окисления синтетических моделей лигнина персульфатом [222]. В отсутствие катализаторов скорость этой реакции в водной среде определяется лишь диссоциацией персульфатных дианионов в сульфатные анион-радикалы, которые, собственно, и являются одноэлектронными окислителями: $S_2O_8^{2-} \rightleftharpoons 2SO_4^{\cdot-}$. Оказалось, что начальная скорость образования альдегидов из бензиловых спиртов тем меньше, чем больше метоксильных заместителей в ароматическом кольце (см. табл. 5). Данный эффект обусловлен увеличением вклада конкурирующей реакции окислительно-гидролитического деметилирования. В неводной среде, где эта реакция исключена, скорость образования альдегидов либо не зависит от числа метоксильных групп, либо возрастает с его увеличением (если узким местом служит не генерация анион-радикалов $SO_4^{\cdot-}$, а их реакция со спиртами). Эти данные демонстрируют, как исключение воды из окружения субстратного катион-радикала сказывается на направлении его превращений.

Изучение персульфатного окисления показывает, что вклад гидролитического деметилирования мал, если альтернативное превращение — фрагментация катион-радикалов протекает с особенно большой скоростью. Такая ситуация характерна для гидробензоинов. Данные, приведенные в табл. 5, показывают, что выход альдегидов здесь отнюдь не падает по мере увеличения числа метоксильных заместителей и состав продуктов таков же, как и при лигниназном окислении в анаэробных условиях. В других случаях, напротив, вклад разрыва $C-C$ -связей столь невелик, что при персульфатном окислении таких веществ в водном растворе соответствующие продукты обнаружить не удается, хотя они доминируют в неводных средах. Именно так обстоит дело с такими моде-

Скорость образования альдегидов при персульфатном окислении моделей лиганда в воде и в ацетонитриле [222] *

Соединение	Скорость мкМ/мин	
	H ₂ O **	CH ₃ CN **
Бензиловый спирт	12,4	0,66
Анисовый спирт	8,2	1,60
Вератриловый спирт	0,76	6,05
3,4,5-Триметоксибензиловый спирт	0	
Гидробензоин	10,0	1,14
грео-3,4,4'-Триметоксигидробензоин	9,2	7,58
грео-3,4-Диметоксигидробензоин (11)	5,3	7,58
3,4-Диметоксифенилбензилкарбинол **	0	4,03
β -О-4-Эфир (9)	0	7,75

* Для всех замещенных гидробензоинов приведена скорость образования вератрового альдегида. Для незамещенного гидробензоина приведено половинное значение скорости образования бензальдегида, т. е. скорость окисления исходного соединения.

** 0,5 мМ субстрат, 25 мМ персульфат калия, pH 1, 40° С. Скорость не зависит от концентрации субстрата.

** 0,5 мМ субстрат, 4 мМ персульфат калия, 15 мМ 18-корона-6, 50° С. Скорость возрастает с увеличением концентрации субстрата.

** Вычислено по росту оптического поглощения при 308 нм в пересчете на вератровый альдегид.

лями лигнина, как β -О-4-эфир (9) и 3,4-диметоксифенилбензилкарбинол.

Итак, похоже, что в водной среде лигниназное окисление лигниноподобных соединений по сравнению с химическим характеризуется меньшим вкладом гидролитического расщепления С-О-связей в первичных катион-радикалах. Подобное различие, если оно действительно существует, несомненно обусловлено тем, что катион-радикалы некоторое время остаются связанными с ферментом и, пока они связаны, фрагментация или повторное окисление более вероятны, чем атака воды. Весьма возможно, что именно в этом проявляется специфика лигниназы как фермента, ориентированного на окисление лигнина. Во всяком случае, при окислении лигниноподобных соединений пероксидазой из хрена или лактопероксидазой вклад разрыва С-О-связей практически таков же, как при персульфатном окислении в водной среде [222]. Степень отклонения от этой величины можно рассматривать как показатель, отражающий влияние фермента на характер превращений первичных катион-радикалов субстрата.

Ведущая роль, которую лигниназе приписывают в разрушении лигнина *Ph. chrysosporium*, обосновывается тем, что она является единственным известным компонентом лигнолитической системы этого гриба, способным окислять нефенольные модели лигнина. Что же касается самого лигнина, природного или синтетического, то *in vitro* лигниназа обычно вызывает не его расщепление, а скорее конденсацию [217, 244] (см., однако, [213, 214]). Отсюда гипотезы о том, что подлинный лигнинолитический фермент (ферменты) еще ожидает своего открытия [6, 218]. Между тем наиболее вероятно, что противоречие это кажущееся. Выше упоминалось, что лигнин содержит определенную долю фенольных остатков. Именно эти остатки окисляются лигниназой в первую очередь, а образующиеся из них феноксильные радикалы ответственны за возникновение дополнительных сшивок. Во всяком случае действие лигниназы на препараты лигнина, предварительно подвергнутые исчерпывающему метилированию, приводит не к конденсации, а к тем же низко-

Кинетические константы (K_m , мкМ; V_m , с⁻¹), описывающие окисление различных моделей лигнина (рН 4, 25° С) изоферментами лигниназы *Ph. chrysosporium* [143]

Изофермент	H ₂ O ₂	Вератриловый спирт *		Соединение (9) *		п-Диметоксибензол **	
	K_m	K_m	V_m	K_m	V_m	K_m	V_m
H1	13	86	3,20	99	1,43	42	1,50
H2	42	250	8,33	78	3,07	132	3,01
H6	34	122	6,58	27	1,06	78	4,17
H7	77	483	5,46	88	0,76	20	—
H8	17	89	1,32	111	0,50	73	8,55
H10	24	190	2,78	444	0,43	192	0,84

* Определено по увеличению поглощения при 310 нм.

** Определено по уменьшению поглощения субстрата при 286 нм; продукты реакции — п-бензохинон и метанол.

молекулярным продуктам деградации, что окисление моделей лигнина [55, 212]. Известно также, что конденсация лигнина уступает место его деполимеризации, если при лигниназном окислении принять меры для уменьшения стационарной концентрации радикальных продуктов, например, снижая концентрацию H₂O₂ [213, 214]. Все эти данные позволяют предположить, что на начальных этапах окисления лигнина доминирует «выгорание» фенольных остатков с их окислительным сочетанием и рекомбинацией феноксильных радикалов и лишь потом их опережает деградация с разрывом С—С- и С—О-связей. В лабораторных опытах такого рода деградацию обнаружить не так просто, поскольку она начинается не сразу и может вообще не начаться из-за инактивации лигниназы избытком перекиси водорода.

Исходя из этого, естественно предположить, что основная функция фенолоксидаз и фенолпероксидаз в лигнолитических ферментных комплексах заключается в том, что они «выжигают» фенольные остатки в лигнине и его фрагментах и тем самым делают эффективным окисление другими ферментами — истинными деструкторами. У *Ph. chrysosporium* эта операция выполняется, по-видимому, с участием Mn-зависимой пероксидазы.

Характер повреждений, наносимых лигнину окислительными ферментами, несомненно, зависит от того, разрушаются ли при их действии преимущественно С—С- или С—О-связи. В этой связи обращают на себя внимание различия между изоформами лигниназы. Используя данные из табл. 6, можно сравнить изоформы H2 и H8 по максимальной скорости трех катализируемых ими реакций — окисления вератрилового спирта, соединения (9) и 1,4-диметоксибензола. В первых двух случаях измерялось количество вератрового альдегида, а в последнем — убыль субстрата (основным продуктом был п-бензохинон — терминальный продукт окислительно-гидролитического деметилирования; см. схему 6). Видно, что изоформа H8 опережает изоформу H2 по скорости деметилирования и отстает от нее по скорости альтернативных реакций, ведущих к вератровому альдегиду.

Привлекательна мысль, что биологический смысл полиморфизма лигниназы заключается в том, что изоформы ориентированы на разрушение разных типов связей в сложной структуре лигнина [222]. Чтобы обосновать эту гипотезу, необходимо больше знать о соотношении вкладов рас-

щепления С—О- и С—С-связей (и вообще о любых проявлениях регио-специфичности) при окислении широкого спектра моделей лигнина различными изоформами лигниназы. Следует отметить, что в настоящее время о скорости окислительно-гидролитического деалкилирования по большей части судят по образованию не первичных, а терминальных продуктов окисления. Это вызвано, как правило, методическими трудностями, например при определении незначительных количеств метанола. По-видимому, преодолеть эти трудности могут помочь субстраты, содержащие не диметоксифенильные, а метилendioксифенильные остатки. Разрыв С—О-связи в таких субстратах сопровождается отщеплением гораздо легче определяемого формальдегида [245]. В частности, удалось показать, что при действии пероксидазы из хрена, а также при персульфатном окислении в водной среде вклад разрыва С—О-связей пренебрежимо мал в случае 3,4-метилendioксигидробензоина и соизмерим с образованием альдегида у пиперонилового спирта.

Выше отмечалось, что в лигнолитических ферментных комплексах многих грибов-деструкторов нет лигниназ, т. е. пероксидаз, окисляющих вератриловый спирт в вератриловый альдегид. В свете сказанного важно проверить, не окисляют ли эти комплексы, как и лигниназа, нефенольные аналоги лигнина, в том числе вератриловый спирт, но, в отличие от лигниназы, с преимущественным разрывом С—О-связей. Вообще представляется правильным при классификации лигнолитических окислительных ферментов исходить не из их способности генерировать определенные продукты из некоторых субстратов (выбранных произвольно или из соображений методической простоты), а из более общих свойств: редокс-потенциала и соотношения эффективных скоростей вторичного окисления и гидролиза катион-радикалов.

Такой подход, по нашему мнению, не только придаст этой классификации разумное химическое обоснование, но также создаст предпосылки для решения более общей проблемы — выяснения принципов и способов реализации тех стратегий, которые выбирают лигнолитические организмы для достижения своих физиологических задач, связанных с деструкцией лигнина. Только понимая, почему для нанесения определенных повреждений лигнину выбирается именно такой набор ферментов, биологи и химики смогут рационально подходить к селекции и конструированию биологических деструкторов лигнина.

* * *

Авторы выражают глубокую признательность академику АМН СССР А. И. Арчакову, пробудившему в них интерес к лигнину и лигниназе и неизменно поддерживающему их работу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Higuchi T. // Adv. Enzymol. 1971. V. 34. P. 207–283.
2. Kirk T. K., Farrell R. L. // Ann. Rev. Microbiol. 1987. V. 41. P. 465–505.
3. Buswell J. A., Odier E. // CRC Crit. Rev. Biotechnol. 1987. V. 6. № 1. P. 1–60.
4. Tien M. // CRC Crit. Rev. Microbiol. 1987. V. 15. № 2. P. 141–168.
5. Higuchi T. // Wood Res. 1987. V. 73. № 1. P. 58–81.
6. Kirk T. K. // Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation (Proc. of FMS Symp. № 43, Paris, 1987; Eds Aubert J.-P., Beguin P., Millet J.). Acad. Press Inc. 1988. P. 315–332.
7. Eriksson K.-E. // Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation (Proc. FMS Symp. № 43, Paris, 1987; Eds Aubert J.-P., Beguin P., Millet J.). Acad. Press Inc. 1988. P. 285–302.
8. Tien M., Kirk T. K. // Meth. Enzymol. 1988. V. 161. Pt. B. P. 238–249.
9. Gold M. H., Wariishi H., Valli K. // ACS Symposium Series. 1989. V. 389. P. 127–140.

10. *Lewis N. G., Yamamoto E.* // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1990. V. 41. P. 455-496.
11. Общая органическая химия. Пер. с англ. М.: Химия, 1982. Т. 2. С. 175.
12. *Hwang R. H., Kennedy J. F., Melo E. H. M., Jumel K.* // Carbohydrate Polymers. 1990. V. 14. № 1. P. 77-88.
13. *Шемьякин М. М., Хозлов А. С., Колосов М. Н., Бергельсон Л. Д., Антонов В. К.* Химия антибиотиков. М.: Изд. АН СССР, 1961. Т. 1. С. 501.
14. *Kern H. W.* // Microbial Degradation of Xenobiotics and Recalcitrant Compounds (Proc. FEMS Symp. № 12. Zurich, 1980. Ed. Leisinger T.). London: Acad. Press Inc., 1981. P. 300-305.
15. *Kirk T. K., Connors W. J., Bleam R. D., Hackett W. F., Zeikus J. G.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1975. V. 72. № 7. P. 2515-2519.
16. *Haider K., Kern H., Ernst L.* // Meth. Enzymol. 1988. V. 161. Pt. B. P. 47-56.
17. *Kirk T. K., Brunow G.* // Meth. Enzymol. 1988. V. 161. Pt. B. P. 65-73.
18. *Evans J. J., Himmelsbach D. S.* // J. Agr. Food Chem. 1991. V. 39. № 5. P. 830-832.
19. *Гравирус Я. А.* Структурная организация лигнинов: Автореф. докт. дисс. Рига: Инст. химии древесины АН ЛатвССР, 1989. С. 1-33.
20. *Hwang R. H., Kennedy J. F., Melo E. H. M., White C. A.* // Carbohydrate Polymers. 1989. V. 10. № 1. P. 15-30.
21. *Azuma J.-I., Tetsuo K.* // Meth. Enzymol. 1988. V. 161. Pt. B. P. 12-18.
22. *Obst J. R., Kirk T. K.* // Meth. Enzymol. 1988. V. 161. Pt. B. P. 3-12.
23. *Закус Г. Ф.* Синтез модельных соединений лигнина. Рига: Зинатне, 1980.
24. *Pasti M. B., Pometto A. L., Nuti M. P., Crawford D. L.* // Appl. Environm. Microbiol. 1990. V. 56. № 7. P. 2213-2218.
25. *Crawford D. L.* // Enzyme Microb. Technol. 1980. V. 2. № 1. P. 11-22.
26. *Salk-Inst. Biotechnol.* // Пат. США 4960699, заявл. 9.05.88, опубл. 2.10.90.
27. *Catcheside D. E. A.* // Aust. Biotechnol. Conf., 8-th Meet., 1989. P. 582-585; цит. по базе данных DERWENT; № 91-05799.
28. *Clyde R. A.* // Abstr. Pap. Amer. Chem. Soc. (200 Meet.). Pt. 1. Fuel. № 44. 1990; цит. по базе данных DERWENT; № 91-04004.
29. *Bumpus J. A., Tien M., Wright D., Aust S. D.* // Science. 1985. V. 228. № 4706. P. 1434-1436.
30. *Eaton D. C.* // Enzyme Microb. Technol. 1985. V. 7. № 5. P. 194-196.
31. *Sundman G., Kirk T. K., Chang H.-M.* // TAPPI J. 1981. V. 64. N 9. P. 145-148.
32. *Huyh V. B., Chang H.-M., Joyce T. W., Kirk T. K.* // TAPPI J. 1985. V. 67. № 7. P. 96-102.
33. *Kennedy D. W., Aust S. D., Bumpus J. A.* // Appl. Environm. Microbiol. 1990. V. 56. № 8. P. 2347-2353.
34. *Galeno G., Agosin E.* // Biotechnol. Lett. 1990. V. 12. № 11. P. 869-872.
35. *Lamar R. T., Larsen M. J., Kirk T. K.* // Appl. Environm. Microbiol. 1990. V. 56. № 11. P. 3519-3526.
36. *Lamar R. T., Dietrich D. M.* // Appl. Environm. Microbiol. 1990. V. 56. № 10. P. 3093-3100.
37. *Valli K., Gold M. H.* // J. Bacteriol. 1991. V. 173. № 1. P. 345-352.
38. *Haemmerly S. D., Leisola M. S. A., Sanglard D., Fiechter A.* // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. № 15. P. 6900-6903.
39. *Hammel K. E., Kalyanaraman B., Kirk T. K.* // Lignin Enzymic And Microbial Degradation (Proc. of INRA Symp. № 40. Paris. 1987). Publ. by INRA. Paris. 1987. P. 45-49.
40. *Morgan P., Lewis S. T., Watkinson R. J.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1991. V. 34. № 5. P. 693-696.
41. *Lin J. E., Wang H. Y., Hickey R. F.* // Biotechnol. Bioeng. 1990. V. 35. № 11. P. 1125-1134.
42. *Archibald F., Paice M. G., Jurasek L.* // FEBS Lett. 1990. V. 12. № 11. P. 846-853.
43. *Vicuna R.* // Enzyme Microb. Technol. 1988. V. 10. № 11. P. 646-655.
44. *Gonzalez B., Vicuna R.* // Arch. Biol. Med. Exp. 1990. V. 23. № 2. P. 151-157.
45. *Crawford D. L., Pometto A. L., Crawford R. L.* // Appl. Environm. Microbiol. 1983. V. 45. № 3. P. 898-904.
46. *Pometto A. L., Crawford D. L.* // Appl. Environm. Microbiol. 1986. V. 51. № 1. P. 171-179.
47. *Crawford D. L., Pometto III A. L.* // Meth. Enzymol. 1988. V. 161. Pt. B. P. 35-47.
48. *Crawford D. L., Pometto III A. L.* // Meth. Enzymol. 1988. V. 161. Pt. B. P. 249-258.
49. *Antai S. P., Iyo A. H.* // J. Basic Microbiol. 1990. V. 30. № 9. P. 643-647.
50. *Bourbonnais R., Paice M. G.* // FEBS Lett. 1990. V. 267. № 1. P. 99-102.
51. *Leontevskaa L. A., Golovleva L. A.* // Appl. Environm. Microbiol. 1990. V. 55. № 3. P. 312-318.
52. *Леонтьевский Л. А., Головлева Л. А.* // Биохимия. 1990. Т. 55. № 3. С. 423-431.
53. *Леонтьевский Л. А., Мясоедова Н. М., Мальцева О. В., Терзигарова Н. Г., Крунянко В. И., Головлева Л. А.* // Биохимия. 1990. Т. 55. № 10. С. 1841-1846.

54. *Maltseva O. V., Niku-Paavola M. L., Leontievsky L. A., Myasoedova N. M., Golovleva L. A.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1991. V. 13. № 3. P. 291–302.
55. *Tien M., Kirk T. K.* // Science. 1983. V. 221. № 4611. P. 661–662.
56. *Glenn J. K., Morgan M. A., Mayfield M. B., Kuwahara M., Gold M. H.* // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1983. V. 114. № 3. P. 1077–1083.
57. *Tien M., Kirk T. K.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 8. P. 2280–2284.
58. *Gold M. H., Kuwahara M., Chiu A. A., Glenn J. K.* // Arch. Biochem. and Biophys. 1984. V. 234. № 2. P. 353–362.
59. *Kuwahara M., Glenn J. K., Morgan M. A., Gold M. H.* // FEBS Lett. 1984. V. 169. № 2. P. 247–250.
60. *Faison B., Kirk T. K.* // Appl. Environm. Microbiol. 1985. V. 49. № 2. P. 299–304.
61. *Kuila D., Tien M., Fee J. A., Ondrias M. R.* // Biochemistry. 1985. V. 24. № 14. P. 3394–3397.
62. *Hammel K. E., Tien M., Kalyanaraman B., Kirk T. K.* // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. № 14. P. 8338–8353.
63. *Harvey P. J., Schoemaker H. E., Bowen R. M., Palmer J. M.* // FEBS Lett. 1985. V. 183. № 1. P. 13–16.
64. *Tien M., Kirk T. K., Bull C., Fee J. A.* // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. № 4. P. 1687–1693.
65. *Glenn J. K., Gold M. H.* // Arch. Biochem. and Biophys. 1985. V. 242. № 2. P. 329–341.
66. *Paszczynski A., Huynh V.-B., Crawford R. L.* // FEMS Microbiol. Lett. 1985. V. 29. № 1–2. P. 37–41.
67. *Paszczynski A., Huynh V.-B., Crawford R. L.* // Arch. Biochem. and Biophys. 1986. V. 244. № 2. P. 750–765.
68. *Karhunen E., Kantelinen A., Niku-Paavola M. L.* // Arch. Biochem. and Biophys. 1990. V. 279. № 1. P. 25–31.
69. *Bonnarme P., Jeffries T. W.* // Appl. Environm. Microbiol. 1990. V. 56. № 1. P. 210–217.
70. *Perie F. H., Gold M. H.* // Appl. Environm. Microbiol. 1991. V. 57. № 8. P. 2240–2245.
71. *Brown J. A., Alic M., Gold M. H.* // J. Bacteriol. 1991. V. 173. № 13. P. 4101–4106.
72. *Leatham G. F.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1986. V. 24. № 1. P. 51–58.
73. *Wariishi H., Valli K., Gold M. H.* // Biochem. and Biophys. 1991. V. 176. № 1. P. 269–275.
74. *Galliano H., Gas G., Seris J. L., Boudet A. M.* // Enzyme Microb. Technol. 1991. V. 13. № 6. P. 478–482.
75. *Kelley R. L., Reddy C. A.* // Arch. Microbiol. 1986. V. 144. № 3. P. 248–253.
76. *Kelley R. L., Reddy C. A.* // J. Bacteriol. 1986. V. 166. № 1. P. 269–274.
77. *Eriksson K.-E., Petterson B., Volc J., Musilec V.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1986. V. 23. № 3–4. P. 257–262.
78. *Kelley R. L., Reddy C. A.* // Meth. Enzymol. 1988. V. 161. Pt. B. P. 307–315.
79. *Volc J., Eriksson K.-E.* // Meth. Enzymol. 1988. V. 161. Pt. B. P. 316–322.
80. *Ramasamy K., Kelley R. L., Reddy C. A.* // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1985. V. 131. № 1. P. 436–441.
81. *Kelley R. L.* // Arch. Microbiol. 1986. V. 144. № 3. P. 254–257.
82. *Kersten P. J., Kirk T. K.* // J. Bacteriol. 1987. V. 169. № 5. P. 2195–2202.
83. *Kersten P. J.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. № 8. P. 2936–2940.
84. *Greene R. V., Gould J. M.* // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1984. V. 118. № 2. P. 437–443.
85. *Eriksson K.-E., Nishido A.* // Meth. Enzymol. 1988. V. 161. Pt. B. P. 322–326.
86. *Ander P., Eriksson K.-E.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1985. V. 21. № 1–2. P. 96–102.
87. *Dodson P. J., Evans C. S., Harvey P. J., Palmer J. M.* // FEMS Microbiol. Lett. 1987. V. 42. № 1. P. 17–22.
88. *Waldner R., Leisola M. S. A., Fiechter A.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1988. V. 29. № 4. P. 400–407.
89. *Jonsson L., Karlsson O., Lundquist K., Nyman P. O.* // FEBS Lett. 1989. V. 247. № 1. P. 143–146.
90. *Niku-Paavola M.-L.* // Lignin Enzymic and Microbial Degradation (Proc. of INRA Symp. № 40. Paris. 1987). Publ. by INRA. Paris, 1987. P. 119–123.
91. *Niku-Paavola M.-L., Karhunen E., Salola P., Raunio V.* // Biochem. J. 1988. V. 254. № 3. P. 877–884.
92. *Kantelinen A., Waldner R., Niku-Paavola M. L., Leisola M. S. A.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1988. V. 28. № 2. P. 193–199.
93. *Keyser P., Kirk T. K., Zeikus J. G.* // J. Bacteriol. 1978. V. 135. № 3. P. 790–797.
94. *Kirk T. K., Schultz E., Connors W. J., Lorenz E. F., Zeikus J. G.* // Arch. Microbiol. 1978. V. 117. № 3. P. 277–285.
95. *Jeffries T. W., Choi S., Kirk T. K.* // Appl. Environm. Microbiol. 1981. V. 42. № 2. P. 290–296.
96. *Leatham G. F., Kirk T. K.* // FEMS Microbiol. Lett. 1983. V. 16. № 1. P. 65–67.

97. *Leisola M. S. A., Thanei-Wyss U., Fiechter A.* // J. Biotechnol. 1985. V. 3. № 1-2. P. 97-107.
98. *Tonon F., Decastro C. P., Odier E.* // Exp. Mycol. 1990. V. 14. № 3. P. 243-254.
99. *Kirk T. K., Croan S., Tien M., Murtagh K. E., Farrell R. L.* // Enzyme Microb. Technol. 1986. V. 8. № 1. P. 27-32.
100. *Leisola M. S. A., Ulmer D. C., Fiechter A.* // Arch. Microbiol. 1984. V. 137. № 2. P. 171-175.
101. *Dosoretz C. G., Chen H.-C., Grethlein H. E.* // Appl. Environm. Microbiol. 1990. V. 56. № 2. P. 395-400.
102. *Dosoretz C. G., Dass S. B., Reddy C. A., Grethlein H. E.* // Appl. Environm. Microbiol. 1990. V. 56. № 11. P. 3429-3434.
103. *Shimada M., Nakatsubo F., Kirk T. K., Higuchi T.* // Arch. Microbiol. 1981. V. 129. № 4. P. 321-324.
104. *Leisola M. S. A., Ulmer D. C., Waldner R., Fiechter A.* // J. Biotechnol. 1984. V. 1. № 5-6. P. 331-339.
105. *Tonon F., Odier E.* // Appl. Environm. Microbiol. 1988. V. 54. № 2. P. 466-472.
106. *Faison B. D., Kirk T. K., Farrell R. L.* // Appl. Environm. Microbiol. 1986. V. 52. № 2. P. 251-254.
107. *Harvey P. J., Schoemaker H. E., Palmer J. M.* // FEBS Lett. 1986. V. 195. № 1-2. P. 242-246.
108. *Harvey P. J., Shoemaker H. E., Palmer J. M.* // Plant. Cell and Environment. 1987. V. 10. № 9. P. 709-714.
109. *Valli K., Wariishi H., Gold M. H.* // Biochemistry. 1990. V. 29. № 17. P. 8535-8539.
110. *Liebeskind M., Hocker H., Wandrey C., Jager A. G.* // FEMS Microbiol. Lett. 1990. V. 71. № 3. P. 325-330.
111. *Kern H. W.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1990. V. 33. № 5. P. 582-588.
112. *Kirkpatrick N., Palmer J. M.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1989. V. 30. № 3. P. 305-311.
113. *Bono J. J., Goulas P., Boc J. F., Portet N., Seris J. L.* // Eur. J. Biochem. 1990. V. 192. № 1. P. 189-193.
114. *Bonnarme P., Jeffries T. W.* // J. Ferment. Bioeng. 1990. V. 70. № 3. P. 158-163.
115. *Dosoretz C. G., Chen A. H. C., Grethlein H. E.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1990. V. 34. № 1. P. 131-137.
116. *Jager A., Croan S., Kirk T. K.* // Appl. Environm. Microbiol. 1985. V. 50. № 5. P. 1274-1278.
117. *Leisola M. S. A., Fiechter A.* // FEMS Microbiol. Lett. 1985. V. 29. № 1-2. P. 33-36.
118. *Reid I., Chao E. E., Dawson P. S. S.* // Can. J. Microbiol. 1985. V. 33. № 1. P. 88-90.
119. *Asther M., Corrieu G., Drapton R., Odier E.* // Enzyme Microb. Technol. 1987. V. 9. № 4. P. 245-249.
120. *Asther M., Tonon F., Corrieu G., Odier E.* // Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation (Proc. of FMS Symp. № 43, Paris, 1987; Eds Aubert J.-P., Beguin P., Millet J.). Acad. Press Inc. 1988. P. 315-332.
121. *Venkataadri R., Irvine R. L.* // Appl. Environm. Microbiol. 1990. V. 56. № 9. P. 2684-2691.
122. *Linko S., Zhong L. C.* // Bioprocess Eng. 1991. V. 6. № 1-2. P. 43-48.
123. *Janshekar H., Fiechter A.* // J. Biotechnol. 1988. V. 8. № 2. P. 97-112.
124. *Linko S.* // J. Biotechnol. 1988. V. 8. № 2. P. 163-170.
125. *Kirkpatrick N., Palmer J. M.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1987. V. 27. № 2. P. 129-133.
126. *Cornwell K. L., Tinlandbutez M. F., Tardone P. J., Cabasso I., Hammel K. E.* // Enzyme Microb. Technol. 1990. V. 12. № 12. P. 916-920.
127. *Linko S., Hujanen M.* // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1990. V. 613. P. 764-770.
128. *Chen A. H. C., Dosoretz C. G., Grethlein H. E.* // Enzyme Microb. Technol. 1991. V. 13. № 5. P. 404-407.
129. *Bonnarme P., Delattre M., Corrieu G., Asther M.* // Enzyme Microb. Technol. 1991. V. 13. № 9. P. 727-733.
130. *Dass S. B., Reddy C. A.* // FEMS Microbiol. Lett. 1990. V. 69. № 3. P. 221-224.
131. *Asther M., Lesage L., Drapton R., Corrieu G., Odier E.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1988. V. 27. № 4. P. 393-398.
132. *Capdevila C., Moukha S., Ghyczy M., Theilleux J., Gelie B., Delattre M., Corrieu G., Asther M.* // Appl. Environm. Microbiol. 1990. V. 56. № 12. P. 3811-3816.
133. *Asther M., Capdevila C., Corrieu G.* // Appl. Environm. Microbiol. 1988. V. 54. № 12. P. 3194-3196.
134. *Asther M., Bellon-Fontaine M.-N., Capdevila C., Corrieu G.* // Biotechnol. Bioeng. 1990. V. 35. P. 477-482.
135. *Barclay C. D., Moore D. M., Lander S. R., Legge R. L.* // Enzyme Microb. Technol. 1990. V. 12. № 10. P. 778-782.
136. *Boominathan K., Dass S. B., Randall T. A., Reddy C. A.* // Arch. Microbiol. 1990. V. 153. № 6. P. 521-527.
137. *Tien M., Myer S. B.* // Appl. Environm. Microbiol. 1990. V. 56. № 8. P. 2540-2544.

138. *Randall T., Reddy C. A., Boominathan K.* // *J. Bacteriol.* 1991. V. 173. № 2. P. 776-782.
139. *Wang Z., Bleakley B. H., Crawford D. L.* // *J. Cell. Biochem.* 1990. Suppl. 14A, CC 115.
140. *Oji-Paper* // Пат. Япон. 2303483, заявл. 17.05.89, опублик. 17.12.90.
141. *Kimura Y., Asada Y., Oka T., Kuwahara M.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1991. V. 35. № 4. P. 510-514.
142. *Vilster H., Asther M., Meunier J. C.* // *Planta Med.* 1990. V. 56. № 6. P. 614.
143. *Farrel R. L., Murtagh K. E., Tien M., Mozuch M. D., Kirk T. K.* // *Enzyme Microb. Technol.* 1989. V. 11. № 6. P. 322-328.
144. *Glumoff T., Harvey P. J., Molinari S., Goble M., Frank G., Palmer J. M., Smit J. D. G., Leisola M. S. A.* // *Eur. J. Biochem.* 1990. V. 187. № 3. P. 515-520.
145. *Fawer M. S., Stierli J., Cliffe S., Fiechter A.* // *Biochim. et biophys. acta.* 1991. V. 1076. № 1. P. 15-22.
146. *Renganathan V., Miki K., Gold M. H.* // *Arch. Biochem. and Biophys.* 1985. V. 241. № 1. P. 304-314.
147. *Leisola M. S. A., Kozulic B., Meusdoerffer F., Fiechter A.* // *J. Biol. Chem.* 1987. V. 262. № 1. P. 419-424.
148. *Zhang Y. Z., Zylstra G. J., Olsen R. H., Reddy C. A.* // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1986. V. 137. № 2. P. 649-656.
149. *Tien M., Tu C.-P. D.* // *Nature.* 1987. V. 326. № 6112. P. 520-523.
150. *Asada Y., Kimura Y., Kuwahara M., Tsukamoto A., Koide K., Oka A., Takanami M.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1988. V. 29. № 5. P. 469-473.
151. *Walther I., Kalin M., Reiser J., Suter F., Saloheimo M., Leisola M., Teeri T., Knowles J. K. C.* // *Gene.* 1988. V. 70. № 1. P. 127-138.
152. *Smith T. L., Schlach H., Gaskell J., Covert S., Cullen D.* // *Nucl. Acids Res.* 1988. V. 16. № 3. P. 1219.
153. *Brown A., Sims P. F. G., Raeder U., Broda P.* // *Gene.* 1988. V. 73. № 1. P. 77-85.
154. *Zhang Y. Z., Reddy C. A.* // *Meth. Enzymol.* 1988. V. 161. Pt. B. P. 228-237.
155. *Huoponen K., Ollikka P., Kalin M., Walther I., Mantsala P., Reiser J.* // *Gene.* 1990. V. 89. № 1. P. 145-150.
156. *Naidu P. S., Zhang Y. Z., Reddy C. A.* // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1990. V. 173. № 3. P. 994-1000.
157. *Naidu P. S., Reddy C. A.* // *Nucl. Acids Res.* 1990. V. 18. № 23. P. 7173-7180.
158. *Krejci R., Homolka L.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1991. V. 57. № 1. P. 151-156.
159. *Gaskell J., Dieperink E., Cullen D.* // *Nucl. Acids Res.* 1991. V. 19. № 3. P. 599-603.
160. *Zhang Y. Z., Reddy C. A., Rasooly A.* // *Gene.* 1991. V. 97. № 2. P. 191-198.
161. *Black A. K., Reddy C. A.* // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1991. V. 179. № 1. P. 428-435.
162. *Kuan I.-C., Tien M.* // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. № 34. P. 20350-20355.
163. *Troller J., Smit J. D. G., Leisola M. S. A., Kallen J., Winterhalter K. H., Fiechter A.* // *Biotechnology.* 1988. V. 6. № 5. P. 571-573.
164. *Maione T. E., Javaherian K., Belew M. A., Gomez L. E., Farrell R.* // *Lignin Enzymic And Microbial Degradation (Proc. of INRA Symp. № 40. Paris, 1987). Publ. by INRA. Paris, 1987. P. 177-183.*
165. *Morohoshi N.* // *Abstr. Pap. Amer. Chem. Soc.* 1990. (199-th Meet.), Pt. 1, Cell N37; цит. по базе данных DERWENT N90-10238.
166. *Godfrey B. J., Mayfield M. B., Brown J. A., Gold M. H.* // *Gene.* 1990. V. 93. № 1. P. 119-124.
167. *Mino Y., Wariishi H., Blackburn N. J., Loehr T. M., Gold M. H.* // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. P. 7029-7036.
168. *Pribnow D., Mayfield M. B., Nipper V. J., Brown J. A., Gold M. H.* // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. № 9. P. 5036-5040.
169. *Andersson L. A., Renganathan V., Chiu A. A., Loehr T. M., Gold M. H.* // *J. Biol. Chem.* 1985. V. 260. № 10. P. 6080-6087.
170. *Andersson L. A., Renganathan V., Loehr T. M., Gold M. H.* // *Biochemistry.* 1987. V. 26. № 8. P. 2258-2263.
171. *Smulevich G., English A. M., Mantini A. R., Marzocchi M. P.* // *Biochemistry.* 1991. V. 30. № 3. P. 772-779.
172. *Tuisel H., Grover T. A., Lancaster J. R., Bumpus J. A., Aust S. D.* // *Arch. Biochem. and Biophys.* 1991. V. 288. № 2. P. 456-462.
173. *Dunford H. B., Stillman I. S.* // *Coord. Chem. Rev.* 1976. V. 19. № 3. P. 187-251.
174. *Dunford H. B.* // *Adv. Inorgan. Biochem.* 1982. V. 4. P. 41-68.
175. *Poulos T. L., Kraut J.* // *J. Biol. Chem.* 1980. V. 255. № 17. P. 8199-8205.
176. *Frew J. E., Jones P.* // *Adv. Inorgan. Bioinorgan. Mech.* 1984. V. 3. P. 175-212.
177. *De Ropp J. S., Thanabal V., La Mar G. N.* // *J. Amer. Chem. Soc.* 1985. V. 107. № 26. P. 8268-8270.
178. *Thanabal V., De Ropp J. S., La Mar G. N.* // *J. Amer. Chem. Soc.* 1987. V. 109. № 24. P. 7516-7525.

179. De Montellano P. R. O. // *Acc. Chem. Res.* 1987. V. 20. № 8. P. 289–294.
180. La Mar G. N., Thanabal V., De Ropp J. S. // *Biochemistry.* 1989. V. 28. № 4. P. 1934.
181. Henrissat B., Saloheimo M., Lavaitte S., Knowles J. K. C. // *Protein-Struct. Funct. Genet.* 1990. V. 8. № 3. P. 251–257.
182. Schmidt H. W. H., Haemmerli S. D., Schoemaker H. E., Leisola M. S. A. // *Biochemistry.* 1989. V. 28. № 4. P. 1776–1783.
183. Renganathan V., Miki K., Gold M. H. // *Arch. Biochem. and Biophys.* 1986. V. 246. № 1. P. 155–161.
184. Kersten P. J., Tien M., Kalyanaraman B., Kirk T. K. // *J. Biol. Chem.* 1985. V. 260. № 5. P. 2609–2612.
185. Hammel K. E., Kalyanaraman B., Kirk T. K. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1986. V. 83. № 11. P. 3708–3712.
186. Schoemaker H. E., Harvey P. J., Bowen R. M., Palmer J. M. // *FEBS Lett.* 1985. V. 183. № 1. P. 7–12.
187. Marquez L., Wariishi H., Dunford H. B., Gold M. H. // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. № 22. P. 10549–10552.
188. Harvey P. J., Palmer J. M., Schoemaker H. E., Dekker H. L., Wever R. // *Biochim. et biophys. acta.* 1989. V. 994. № 1. P. 59–63.
189. Renganathan V., Gold M. H. // *Biochemistry.* 1986. V. 25. № 7. P. 1626–1631.
190. Andrawis A., Johnson K. A., Tien M. // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. № 3. P. 1195–1198.
191. Hewson W. D., Dunford H. B. // *Canad. J. Chem.* 1975. V. 53. № 13. P. 1928–1932.
192. Davies D. M., Jones P., Mantle D. // *Biochem. J.* 1976. V. 157. № 1. P. 247–253.
193. Poulos T. L., Freer S. T., Alden R. A., Edwards S. L., Skogland U., Takio K., Eriksson B., Xuong N.-H., Yonetani T. // *J. Biol. Chem.* 1980. V. 255. № 2. P. 575–580.
194. Araiso T., Dunford H. B. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1980. V. 94. № 4. P. 1177–1182.
195. Lambier A.-M., Dunford H. B., Pickard M. A. // *J. Inorgan. Biochem.* 1983. V. 19. № 4. P. 291–300.
196. Cai D. Y., Tien H. // *Arch. Biochem. and Biophys.* 1991. V. 266. № 22. P. 14464–14469.
197. Gilardi G., Harvey P. J., Cass A. E. G., Palmer J. M. // *Biochim. et biophys. acta.* 1990. V. 1041. № 2. P. 129–132.
198. Harvey P. J., Schoemaker H. E., Palmer J. M. // *Lignin Enzymic and Microbial Degradation (Proc. of INRA Symp. № 40. Paris, 1987).* Publ. by INRA. Paris, 1987. P. 145–150.
199. Ageorges A., Pelter A., Ward R. S. // *Acc. Chem. Res.* 1991. V. 30. № 1. P. 121–126.
200. Popp J. L., Kalyanaraman B., Kirk T. K. // *Biochemistry.* 1990. V. 29. № 46. P. 10475–10480.
201. Momohara I., Matsumoto Y., Ishizu A. // *FEBS Lett.* 1990. V. 273. № 1–2. P. 159–162.
202. Akamatsu Y., Ma D. B., Higuchi T., Shimada M. // *FEBS Lett.* 1990. V. 269. № 1. P. 261–263.
203. Wariishi H., Marquez L., Dunford H. B., Gold M. H. // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. № 19. P. 11137–11142.
204. Wariishi H., Gold M. H. // *FEBS Lett.* 1989. V. 243. № 2. P. 165–168.
205. Wariishi H., Gold M. H. // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. № 4. P. 2070–2077.
206. Cai D., Tien M. // *Biochemistry.* 1990. V. 29. № 8. P. 2085–2091.
207. Mylrajan M., Valli K., Wariishi H., Gold M. H., Loehr T. M. // *Biochemistry.* 1990. V. 29. № 41. P. 9617–9623.
208. Nakajima R., Yamazaki I. // *J. Biol. Chem.* 1987. V. 262. № 6. P. 2576–2581.
209. Arnao M. B., Acosta M., Delrio J. A., Varon R., Garcacanas F. // *Biochim. et biophys. acta.* 1990. V. 1041. № 1. P. 43–47.
210. Wariishi H., Dunford H. B., Mac Donald I. D., Gold M. H. // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. № 6. P. 3335–3340.
211. Popp J. L., Kirk T. K. // *Arch. Biochem. and Biophys.* 1991. V. 288. № 1. P. 145–148.
212. Umezawa T., Higuchi T. // *FEBS Lett.* 1989. V. 242. № 2. P. 325–329.
213. Kurek B., Monties B., Odier E. // *Enzyme Microb. Technol.* 1990. V. 12. № 10. P. 771–777.
214. Hammel K. E., Moen M. A. // *Enzyme Microb. Technol.* 1991. V. 13. № 1. P. 15–18.
215. Gabriel J., Homolka L., Krejci R. // *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1990. V. 55. № 7. P. 1866–1872.
216. Kersten P. J., Kalyanaraman B., Hammel K. E., Reinhammar B., Kirk T. K. // *Biochem. J.* 1990. V. 268. № 2. P. 475–480.
217. Odier E., Mozuch M. D., Kalyanaraman B., Kirk T. K. // *Biochimie.* 1988. V. 70. № 6. P. 847–852.

218. *Sarkanen S., Razal R. A., Piccariello T., Yamamoto E., Lewis N. G.* // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. № 6. P. 3636-3643.
219. *Oberg L. G., Glas B., Swanson S. E., Rappe C., Paul K. G.* // Arch. Environm. Contam. Toxicol. 1990. V. 19. № 6. P. 930-938.
220. *Schreiner R. P., Stevens S. E., Jr., Tien M.* // Appl. Environm. Microbiol. 1988. V. 54. № 7. P. 1858-1860.
221. *Millis C. D., Cai D., Stankovich M. T., Tien M.* // Biochemistry. 1989. V. 28. № 21. P. 8484-8489.
222. *Шкроб А. М., Лесур М. Н., Арчаков А. И.* // Биооргани. химия. 1989. Т. 15. № 1. С. 53-69.
223. *Forrester I. T., Grabski A. C., Burgess R., Leatham G. F.* // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1988. V. 157. № 3. P. 992-999.
224. *Wariishi H., Valli K., Renganathan V., Gold M. H.* // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. № 24. P. 14185-14191.
225. *Mceldoon J. P., Dordick J. S.* // Arch. Biochem. and Biophys. 1991. V. 266. № 22. P. 14288-14293.
226. *Banci L., Bertini I., Turano P., Tien M., Kirk T. K.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. № 16. P. 6956-6960.
227. *Snook M. E., Hamilton G. A.* // J. Amer. Chem. Soc. 1974. V. 96. № 3. P. 860-869.
228. *Umezawa T., Higuchi T.* // FEBS Lett. 1985. V. 192. № 1. P. 147-150.
229. *Habe T., Shimada M., Umezawa T., Higuchi T.* // Agr. Biol. Chem. (Tokyo). 1985. V. 49. № 12. P. 3505-3510.
230. *Huynh V.-B., Paszczynski A., Olson P., Crawford R.* // Arch. Biochem. and Biophys. 1986. V. 250. № 1. P. 186-196.
231. *Miki K., Renganathan V., Gold M. H.* // FEBS Lett. 1986. V. 203. № 2. P. 235-238.
232. *Miki K., Renganathan V., Gold M. H.* // Biochemistry. 1986. V. 25. № 17. P. 4790-4796.
233. *Kirk T. K., Tien M., Kersten P. J., Mozuch M. D., Kalyanaraman B.* // Biochem. J. 1986. V. 236. № 1. P. 279-287.
234. *Umezawa T., Higuchi T.* // FEBS Lett. 1986. V. 205. № 2. P. 293-298.
235. *Umezawa T., Shimada M., Higuchi T., Kusai K.* // FEBS Lett. 1986. V. 205. № 2. P. 287-292.
236. *Umezawa T., Higuchi T.* // FEBS Lett. 1987. V. 218. № 2. P. 255-260.
237. *Jonsson L., Karlsson O., Lundquist K., Nyman P. O.* // FEBS Lett. 1990. V. 276. № 1-2. P. 45-48.
238. *Habe T., Shimada M., Okamoto T., Panijpan B., Higuchi T.* // J. Chem. Soc. Perkin Trans. I. 1985. V. 19. P. 1323.
239. *Hattori T., Shimada M., Umezawa T., Higuchi T., Leisola M. S. A., Fiechter A.* // Agr. Biol. Chem. (Tokyo). 1988. V. 52. № 3. P. 879-880.
240. *Shimada M., Hattori T., Umezawa T., Higuchi T., Okamoto T.* // Lignin Enzymic and Microbial Degradation (Proc. of INRA Symp. № 40. Paris, 1987): Publ. by INRA. Paris, 1987. P. 151-156.
241. *Dolphin D., Nakano T., Maione T. E., Kirk T. K., Farrell R.* // Lignin Enzymic and Microbial Degradation (Proc. of INRA Symp. № 40. Paris, 1987). Publ. by INRA. Paris, 1987. P. 157-162.
242. *Huynh V. B.* // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1986. V. 139. № 3. P. 1104-1110.
243. *Labat G., Meunier B.* // New J. Chem. 1989. V. 13. № 12. P. 801-804.
244. *Haemmerli S. D., Leisola M. S. A., Fiechter A.* // FEMS Microbiol. Lett. 1986. V. 35. № 1. P. 33-36.
245. *Лесур М. Н., Шкроб А. М.* // Тез. докл. V Всесоюзн. конф. «Цитохром Р-450 и модификация макромолекул». Ялта, 1989. С. 329-330.

Поступила в редакцию
30.VIII.1991

LIGNIN AND LIGNINASE

*Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences,
Moscow; * Institute of Biological and Medical Chemistry, Russian Academy of
Medical Sciences, Moscow*

Ligninases (lignin peroxidases) are heme-containing peroxidases excreted by some white-rot fungi as components of their lignolytic multienzyme complexes. These peroxidases functioning at rather acidic media catalyze oxidative cleavage of both synthetic non-phenolic lignin models and many other oxidation-proof compounds (chloroorganic pesticides, carcinogenic hydrocarbons, etc.). Data on the ligninase structure and functions not only shed light of the lignin biodegradation but also open new perspectives in peroxidation chemistry and biotechnology. Many aspects of ligninase catalytic mechanism can be understood in comparative studies of congruent chemical reactions, e. g. peroxodisulfate-supported oxidation, as well as of ligninase-like activity of some plant and animal peroxidases which is also manifested at low pH. Ligninases are not only more powerful oxidative agents than other peroxidases, but also, in contrast to latters, appear to be able control the contributions of C-C and C-O bond splitting in primary radical-cations of substrates. The contribution of the oxidative-hydrolytic dealkylation of radical cations can be considered as one of classification criteria for lignolytic enzymes.