

УДК 547.458.84.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О БИОСИНТЕЗЕ ЛИГНИНА

О. П. Грушников и Н. Н. Шорыгина

Согласно современным представлениям, биосинтез лигнина состоит из двух основных стадий, первая из которых включает образование ароматических мономерных предшественников лигнина, синтезируемых в растениях из двуокиси углерода через углеводы, а вторая — построение из этих мономерных предшественников макромолекулы лигнина.

В обзоре рассмотрены исследования, позволившие установить отдельные стадии биосинтеза ароматических предшественников лигнина в растениях, а также основные закономерности образования полимерного лигнина при его синтезе из кониферилового спирта *in vitro*. Рассмотрены также некоторые аспекты биосинтеза лигнина *in vivo*.

Библиография — 288 наименований.

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	2024
II. Образование мономерных промежуточных соединений в процессе биосинтеза лигнина	2026
III. Исследования образования лигнина из мономерных предшественников	2037
IV. Некоторые аспекты биосинтеза лигнина <i>in vivo</i>	2056

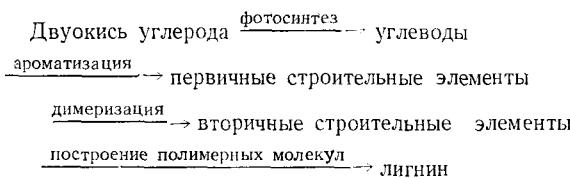
I. ВВЕДЕНИЕ

Не вызывает сомнения, что исследование процесса образования лигнина в растениях представляет значительный теоретический и практический интерес. Как будет показано ниже, выяснение основных аспектов биосинтеза лигнина позволило в значительной степени составить представление о его строении. Очевидно также, что знание закономерностей образования лигнина в растениях необходимо для решения таких важных вопросов химии лигнина, как взаимосвязь между различными компонентами растительной ткани, неоднородность лигнина и т. д. Кроме того, информация об образовании лигнина в растениях может оказаться ценной и при разработке рациональных промышленных методов делигнификации растительного сырья. Наконец, следует подчеркнуть, что исследования процесса биосинтеза лигнина представляют интерес не только для химии древесины, но и для таких разделов биологии, как физиология растений, биохимия растений и т. д.

Вопросы образования лигнина в растениях издавна привлекали к себе внимание химиков, работающих в области химии лигнина, но лишь в 1950—1960-х гг., благодаря применению новых методов исследования (использование соединений с меченными атомами, метод культуры ткани, различные биохимические методы и т. д.), наблюдается значительный прогресс в этой области исследований. Вопросы биосинтеза лигнина в

растениях неоднократно рассматривались в ряде обзоров и монографий^{1–13}, написанных, в основном, специалистами, работавшими в этой области, и поэтому в первую очередь дающих представление о концепциях этих исследователей.

Общую картину процесса биосинтеза лигнина в растениях можно схематично представить следующим образом:



В процессе биосинтеза лигнина можно выделить две основные стадии, первая из которых включает образование ароматических мономерных предшественников лигнина, синтезируемых в растении из двуокиси углерода через углеводы, а вторая — построение из этих мономерных предшественников макромолекул лигнина. Обе эти стадии будут подробно рассмотрены ниже.

Однако при рассмотрении биосинтеза лигнина в растениях не следует забывать, что процесс лигнификации всегда происходит в совокупности с другими процессами, протекающими при формировании клеточной стенки. Из анатомии растений известно, что клетки древесины образуются из живой камбимальной ткани, которая сохраняется в течение всей жизни двудольного растения и от деятельности которой зависит рост ствола в толщину. Благодаря периодической деятельности камбия образующиеся из него элементы древесины отлагаются в течение вегетационного периода с известной последовательностью, в результате чего образуется годичная слоистость. Вторичная древесина представлена, главным образом, проводящими и механическими элементами, рано теряющими свое протоплазматическое содержимое и превращающимися в физиологически мертвые ткани. Но в состав древесины входят также живые клетки древесной паренхимы и сердцевинных лучей; обмен веществ, происходящий в этих клетках, характеризует жизненные свойства вторичной древесины. На основании вышеизложенного представляется очень заманчивой попытка рассмотрения процесса лигнификации растительных клеточных стенок в рамках метаболизма, своего рода камбимальным и меристематическим тканям, поскольку процесс лигнификации является частью сложной биохимической деятельности молодых клеток ксилемы^{14–17}. Однако рассмотрение биосинтеза лигнина в этом аспекте, очевидно, является делом будущего, поскольку в настоящее время ряд биохимических процессов, протекающих при формировании клеточной стенки, еще недостаточно изучен. Тем не менее ниже, в ходе рассмотрения химических аспектов биосинтеза лигнина, будут частично освещены и некоторые вопросы формирования клеточной стенки.

И наконец, образование лигнина — фенольного по своей природе полимера — нельзя рассматривать обособленно от биосинтеза многочисленных фенольных соединений, широко распространенных в растениях (эфирные масла, антоцианины, лигнаны, дубильные вещества, алкалоиды и т. д.). Определенное химическое родство, существующее между элементарными структурными звеньями лигнина и этими фенольными соединениями, очевидно, является следствием сходных процессов биосинтеза ароматических веществ в растительных тканях^{18–20}. По ряду причин эти вопросы также не будут рассмотрены в настоящем обзоре.

II. ОБРАЗОВАНИЕ МОНОМЕРНЫХ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ПРОЦЕССЕ БИОСИНТЕЗА ЛИГНИНА

1. Роль двуокиси углерода в процессе лигнификации

В 1950 г. Харт и Бэр²¹ впервые сообщили о том, что после экспонирования растений сахарного тростника в атмосфере $^{14}\text{CO}_2$ в темноте, лигнин, выделенный из этих растений, обнаруживает радиоактивность. Последующие эксперименты Стоуна, который подверг растения пшеницы как продолжительному²², так и краткосрочному²³ экспонированию в атмосфере $^{14}\text{CO}_2$, убедительно продемонстрировали участие углекислого газа в биосинтезе лигнина. После нитробензольного окисления лигнинов, выделенных из опытных растений пшеницы, получены радиоактивные: ванилин, *p*-оксибензальдегид и сиреневый альдегид. Участие двуокиси углерода в биосинтезе лигнина подтверждено также данными Крейцберг и Сергеевой^{24, 25}, проводившими эксперименты с растениями быстро-растущего тополя. В настоящее время представление о том, что исходным соединением в процессе биосинтеза лигнина высшими растениями служит двуокись углерода, является общепринятым.

2. Роль углеводов в процессе лигнификации

Обширное исследование углеводных предшественников лигнина проведено группой исследователей под руководством Норда и Шуберта.

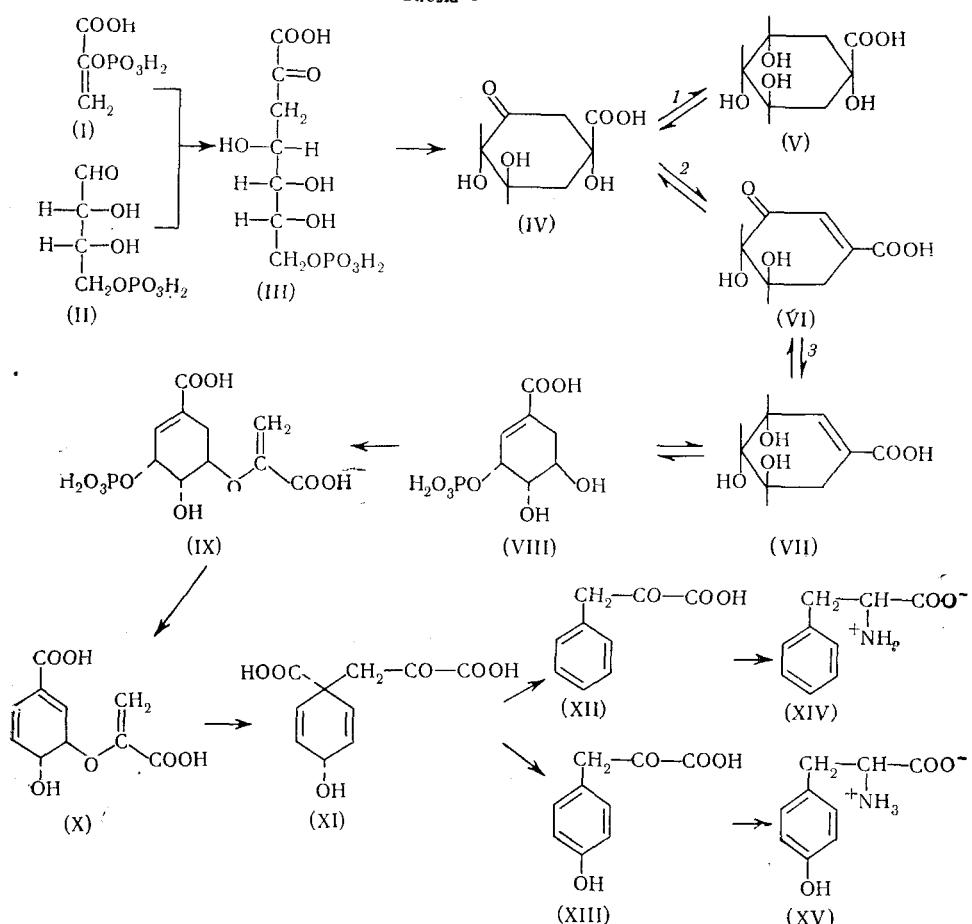
Шуберт и Ацербо²⁶ впервые показали наличие у растений энзиматического механизма превращения *D*-глюкозы в лигнин. Авторы вводили меченую *D*-глюкозу в дерево норвежской ели, из прикамбимального слоя которого после периода метаболизма был выделен радиоактивный лигнин. В дальнейшем исследовании Ацербо, Шуберт и Норд²⁷ подкармливали дерево норвежской ели $1\text{-}^{14}\text{C}$ -*D*-глюкозой и $6\text{-}^{14}\text{C}$ -*D*-глюкозой в течение 28 дней, окисляли выделенный лигнин до ванилина и разрушали последний с целью определения радиоактивности каждого в отдельности атома углерода. Показано, что ^{14}C в обоих случаях включается преимущественно по 2, 6, 7 (карбонил) и 8 (метил) атомам углерода молекулы ванилина. Полученные данные подтвердили Кратцль^{28, 29}. Хасегава и Хигути также показали участие глюкозы в биосинтезе лигнина введением меченой глюкозы в черенки эвкалипта³⁰, а также в экспериментах с культурой ткани³¹.

Однако показано, что *D*-глюкоза не является единственным углеводом, способным превращаться в лигнин. Так, Сергеева и Крейцберг³² после инъекции радиоактивных пентоз в древесину быстрорастущего тополя выделили радиоактивный лигнин. Участие пентоз в образовании макромолекулы лигнина подтвердило гипотезу Класона^{33, 34} о возможности образования лигнина из пентозанов в результате внутриклеточного брожения. Кратцль и Зойнер³⁵ вводили в древесину ели меченный по всем углеродным атомам ксилит и обнаружили, что последний включался как в полисахариды, так и в лигнин.

3. Исследования процесса ароматизации

Классические исследования Дэвиса^{36–38} и Спринсона^{37, 39} на мутантах бактерий *Escherichia coli* позволили с большой достоверностью установить один из путей биосинтеза ароматических аминокислот из углеводных предшественников. Суммарные результаты этих исследований приведены на схеме 1.

Схема 1



Согласно приведенной на схеме 1 последовательности, конденсация 2-фосфоенолпироградной кислоты (I), образующейся в процессе гликолиза глюкозы, и D-эрритрозо-4-фосфата (II), образующегося из глюкозы в цикле превращений фосфата пентозы («пентозный цикл»), приводит к получению 7-фосфат 2-кето-3-дезокси-D-арабиногептоновой кислоты (III), который затем циклизуется в 5-дегидрохинную кислоту (IV). Последующий биосинтез протекает через обязательные промежуточные соединения: 5-дегидрошикимовую (VI) и шикимовую (VII) кислоты. 5-Фосфошикимовая кислота (VIII), соединяясь с молекулой (I), образует 5-фосфат 3-енолпиривишикимовой кислоты (IX), который через промежуточную хоризмовую кислоту (X), наличие которой в данном цикле превращений впервые установлено Гибсоном^{40–42}, превращается в префеновую кислоту (XI). Как показано на схеме 1, префеновая кислота может декарбоксилироваться с образованием ароматических соединений двумя путями, только один из которых включает сохранение гидроксила в кольце. Таким образом, первыми ароматическими соединениями, синтезируемыми мутантами *Escherichia coli* из углеводов, является фенилпироградная кислота (XII) и ее 4-окси-производное (XIII), которые в результате трансаминирования превращаются соответственно в L-фенилаланин (XIV) и L-тирозин (XV). Поскольку приведенная схема под-

робно рассматривается во всех обзорах по биосинтезу лигнина, мы не будем специально останавливаться на ней, отметив лишь, что, согласно данным Дэвиса³⁶, шикимовая кислота (VII) является обязательным промежуточным продуктом биосинтеза ароматических соединений в *Escherichia coli*.

В настоящее время большинство исследователей³⁻¹⁴ полагают, что и в случае высших растений ароматизация углеводного материала происходит через шикимовую кислоту (схема 1). Это представление основывается на ряде соображений. Так, Браун и Нейш⁴³ вводили в раствор со срезанными стеблями пшеницы и черенками клена меченные ¹⁴C соединения: шикимовую кислоту (VII), *L*-фенилаланин (XIV) и протокатеховую кислоту, и показали, что VII и XIV включались в лигнин пшеницы и клена. Эберхардт и Шуберт⁴⁴ осуществили превращение меченоей шикимовой кислоты в ароматические ядра макромолекулы лигнина, проводя имплантацию кислоты в растения сахарного тростника. Ванилин, полученный после нитробензольного окисления лигнина из опытных растений, разлагали с целью определения радиоактивности каждого в отдельности углеродного атома. Оказалось, что атомы ванилина в положениях 6, 2 и 5 содержали 44, 41 и 0% общей радиоактивности, в то время как атомы исходной шикимовой кислоты содержали в тех же положениях 52, 43 и 0% общей радиоактивности. Результаты проведенного исследования убедительно свидетельствуют о превращении шикимовой кислоты в лигнин без какой-либо перегруппировки углеродных атомов в ее шестичленном кольце. Как показано исследованиями Нейша и сотр., меченая шикимовая кислота включается в состав как фенилаланина (XIV), так и тирозина (XV) растениями шалфея^{45, 46}, пшеницы⁴⁷ и грецихи⁴⁷. Поскольку эти растения относятся к различным семействам, авторы высказали предположение, что сосудистые растения в общем могут использовать шикимовую кислоту для синтеза ароматических аминокислот.

Хасегава и сотр.⁴⁸, исследуя распределение шикимовой кислоты (VII) в растениях, установили, что она широко распространена в высших растениях и особенно в голосемянных. Среди последних в наибольших количествах шикимовая кислота обнаружена в семействах сосновых и кипротемерий, а среди покрытосемянных — в семействе магнолиевых. Позднее эти же исследователи⁴⁹ обнаружили шикимовую кислоту в листьях 82 видов растений (из 164 исследованных). Согласно данным Хигучи⁵⁰, из 96 исследованных видов древесных растений 70 содержали шикимовую кислоту. О широком распространении шикимовой кислоты в растениях свидетельствуют также результаты, полученные Плуевые⁵¹⁻⁵⁴.

Помимо рассмотренных выше данных, убедительным свидетельством аналогичности путей биосинтеза ароматических соединений в микроорганизмах и высших растениях является обнаружение в растениях ферментов, которые катализируют некоторые из реакций, указанных на схеме 1. Так, Нанди и Гангули^{55, 56} показали, что в присутствии экстрактов из проростков маш-фасоли *D*-эритрозо-4-фосфат (II) и 2-фосфоенолпиро-виноградная кислота (I) превращаются в 5-дегидрошикимовую кислоту (VI). Митцуласи и Дэвис⁵⁷ обнаружили в горохе и шпинате 5-дегидрохинат — гидро-лиазу (5-дегидрохинат-дегидратазу) (КФ 4.2.1.10) *, которая катализирует превращение IV → VI (путь реакции 2). 5-Дегидрохинат-дегидратаза была выделена также из почек цветной капусты⁵⁹. Балинский и Дэвис^{60, 61} выделили шикимат: НАДФ — оксидоредукта-

* В тех случаях, когда за систематическим названием фермента следует в скобках его номер (шифр), название дается нами согласно международной номенклатуре⁵⁸, в остальных случаях сохраняются авторские обозначения ферментов.

зу* (шикиматдегидрогеназу) (КФ 1.1.1.25) из этиолированных эпикотилей проростков гороха и изучили воздействие на нее различных фенольных соединений. Найдено, что этот фермент связан с НАДФ и не действует на хинную и дегидрохинную кислоты. Нанди и Гангули⁶² выделили шикиматдегидрогеназу из проростков маш-фасоли и нашли, что она в присутствии НАДФ определяет равновесие, сдвинутое в сторону образования шикимовой кислоты. Хигути и Шимада⁶³ исследовали изменения в активности шикимат: НАДФ — оксидоредуктазы в отношении лигнификации бамбука. Следует отметить, что Балинский и Дэвис⁶⁴ выделили из экстрактов некоторых высших растений 5-дегидрохинатдегидратазу и шикиматдегидрогеназу, а Гэмборг⁶⁵ обнаружил указанные ферменты в суспензиях культур растительных клеток ряда растений. По мнению этих исследователей, широкое распространение указанных ферментов свидетельствует об их важной роли в процессе биосинтеза ароматических соединений в высших растениях.

Следует сказать несколько слов о роли хинной кислоты (V) в процессе биосинтеза мономерных предшественников лигнина. Широкое распространение хинной кислоты в высших растениях^{11, 48, 68, 51–54, 66–68}, очевидно, свидетельствует о том, что в процессе биосинтеза ароматических соединений в растениях она может играть более важную роль, чем в случае бактерий. Экспонируя молодые растения розы в атмосфере $^{14}\text{CO}_2$ Уинстейн и сотр.⁶⁹ выделили меченую хинную кислоту, удельная активность которой была выше, чем у шикимовой кислоты, полученной из тех же растений. Последующие эксперименты этих исследователей^{70–72} показали, что при подкормке различных сосудистых растений меченой хинной кислотой, последняя превращается в шикимовую кислоту (VII), фенилаланин (XIV) и тирозин (XV). Гольдшмид и Квимби⁷³ сообщили о взаимном превращении хинной и шикимовой кислот в ветвях тсуги. Данные, полученные Сергеевой и сотр.⁷⁴ при исследовании процесса образования шикимовой и хинной кислот в одногодичных побегах тополя, питаемых $^{14}\text{CO}_2$, свидетельствуют о том, что в процессе роста растения эти кислоты находятся в генетической связи. Гэмборг⁷⁵ осуществил взаимопревращение хинной и шикимовой кислот (пути реакции 1–3 на схеме 1) *in vitro* посредством трех ферментов: 5-дегидрохинат-дегидратазы, шикиматдегидрогеназы и хинат:НАД — оксидоредуктазы (хинатдегидрогеназы) (КФ 1.1.1.24), выделенных из суспензий культур растительных клеток маш-фасоли. Следует отметить, что Гэмборг впервые обнаружил хинатдегидрогеназу в высших растениях⁶⁵ и подробно исследовал свойства этого фермента после выделения его из суспензий культур маш-фасоли⁷⁶.

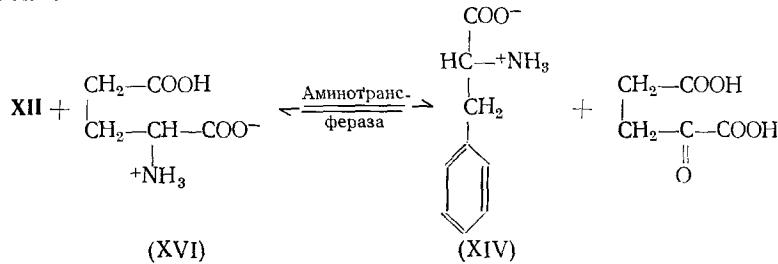
Из реакций, приведенных на схеме 1, наименее изучено превращение шикимовой кислоты (VII) в префеновую кислоту (XI)⁷⁷. До сих пор из микроорганизмов не выделены в чистом виде ферменты, катализирующие отдельные стадии указанного превращения. В высших растениях эти ферменты еще не обнаружены. В связи с этим очевидна необходимость более подробного исследования этого превращения на ферментативном уровне.

Гэмборг и Симпсон⁷⁸ исследовали превращение префеновой кислоты (XI) в фенилаланин (XIV) и тирозин (XV) ферментами, выделенными из растений маш-фасоли. Авторы установили, что в экстрактах из маш-фасоли содержатся аминотрансфераза (трансаминаза), префенат-ароматаза и префенатдегидрогеназа, ответственные за эти превращения, и отметили, что невозможно продемонстрировать энзиматическое обра-

* НАДФ — никотинамидадениндинуклеотидфосфат; НАД — никотинамидадениндинуклеотид.

зование фенилпировиноградной кислоты (XII), поскольку она образуется спонтанно при действии на префенат кислоты. Гэмборг и Кили⁷⁹ выделили из семядолей восковой фасоли префенатдегидрогеназу, которая в присутствии НАДФ катализирует превращение XI→XII. Этот фермент обнаружен также в семядолях и побегах маш-фасоли. Исследование изменений концентрации префенатдегидрогеназы в процессе развития растений маш-фасоли показало, что наивысшая концентрация наблюдается в семядолях на 4—5 день после прорастания.

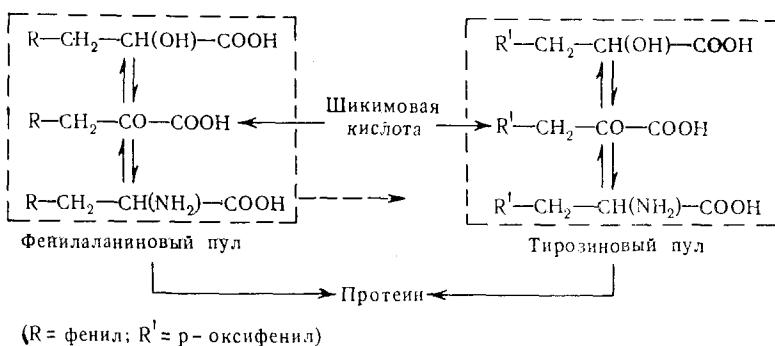
Конечная стадия образования фенилаланина и тирозина, которые играют существенную роль в биосинтезе не только лигнина, но и других растительных фенолов^{18—20}, заключается в трансаминировании кетокислот (XII) и (XIII). Реакции трансаминирования исследованы в различных растениях (люпин, кукуруза, ячмень, горох, овес, маш-фасоль) Вильсоном и сотр.⁸⁰, которые обнаружили в указанных растениях ряд аминотрансферазных систем (α -кетоглутаровая кислота — аланин; α -кетоглутаровая кислота — аспарагиновая кислота; α -кетоглутаровая кислота — глицин; α -кетоглутаровая кислота — фенилаланин; щавелевоуксусная кислота — аланин и пировиноградная кислота — метионин). Из этиолированных проростков белого люпина и освещаемых проростков ячменя авторы выделили аминотрансферазы, катализирующие трансаминирование α -кетоглутаровой кислоты с 17 различными аминокислотами. Проведенные авторами эксперименты с меченными соединениями подтвердили наличие в растениях аминотрансфераз. Кретович и Успенская⁸¹ исследовали образование фенилаланина (XIV) в результате трансаминирования между фенилпировиноградной кислотой (XII) и глутаминовой (XVI) или аспарагиновой кислотой в гомогенатах проростков гороха:



Гэмборг^{82, 83} выделил из молодых растений маш-фасоли аминотрансферазу, катализирующую трансаминирование ряда циклических и ароматических аминокислот (в том числе фенилаланина и тирозина) в присутствии пирувата или α -кетоглутарата, являющихся аминоакцептором.

Исследуя превращения меченой шикимовой кислоты в фенилаланин (XIV) и тирозин (XV) растениями пшеницы и гречихи, Гэмборг и Нейш⁴⁷ отметили легкость взаимных превращений фенилпропаноидных α -окси-, α -оксо- и α -аминокислот, синтезируемых из шикимовой кислоты, и на основании полученных результатов пришли к заключению о существовании двух различных пулов для фенильных и *p*-оксифенильных производных (так называемый «фенилаланиновый пул» и «тироzinовый пул») (схема 2). Внутри каждого пулла наблюдается легкое превращение α -окси- или α -оксо-кислот в соответствующие аминокислоты. В то же время не наблюдалось превращения соединений тирозинового пулла в соединения фенилаланинового пулла (обратное превращение имеет место в незначительной степени). Кроме того, показано, что шикимовая кислота является лучшим предшественником тирозина, чем любое соединение фенилаланинового пулла. Полученные результаты свидетельствуют о том, что растения, подобно бактериям, образуют тирозин из префеновой кис-

Схема 2

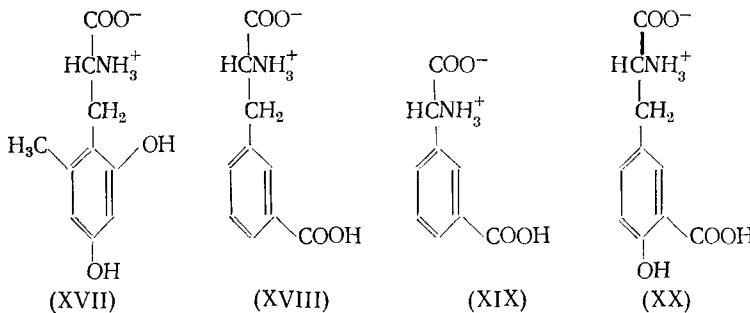


(R = фенил; R' = p-оксифенил)

лоты в результате трансаминирования (схема 1), однако они обладают и другой возможностью, а именно гидроксилированием фенилаланина.

Рассмотренные выше исследования, которые включали как выделение растительных ферментов, так и эксперименты с меченными соединениями, дают основание полагать, что процесс образования ароматических соединений в растениях происходит путем идентичным или очень сходным с последовательностью реакций, представленной на схеме 1. В то же время необходимо отметить, что ряд данных дает основание предположить и наличие иных, чем рассмотренный, путей синтеза ароматических предшественников лигнина в высших растениях. В частности, Нанди и Гангули^{55, 56} обнаружили, что бесклеточный экстракт маш-фасоли превращает глюкозо-6-фосфат и глюкозо-1-фосфат в дегидрошикимовую кислоту. Хигути и Шимада⁸⁴ выделили из побегов бамбука D-глюкозо-6-фосфат: НАДФ — оксидоредуктазу (КФ 1.1.1.49) и 6-фосфоглюконат — НАДФ — оксидоредуктазу (КФ 1.1.1.44) и исследовали активность этих ферментов в отношении лигнификации.

Кроме того, интересно отметить, что помимо фенилаланина и тирозина, в некоторых растениях были обнаружены другие ароматические аминокислоты. Так, Шнейдер⁸⁵ выделил орсилаланин (XVII) из семян *Agrostemma githago*. Из луковиц *Iris tingitana* Томпсон и сотр. выделили *m*-карбокси-L-фенилаланин (XVIII)⁸⁶ и *m*-карбокси-L-фенилглицин (XIX)⁸⁷. Ларсен и Керр⁸⁸ обнаружили *m*-карбокси-L-тироzin (XX) в семенах *Reseda odorata*. К сожалению, опыты по биосинтезу этих аминокислот не проводились, и трудно сказать, образуются ли они через шикимовую кислоту или каким-либо иным путем:



Согласно современным представлениям^{18-20, 89}, существуют два основных пути биосинтеза фенольных соединений: 1) шикиматный и 2) ацетатно-малонатный. Исследования с меченными соединениями, подробно рассмотренные Нейшем⁹⁰, убедительно свидетельствуют о том, что био-

синтез из ацетата не играет заметной роли в процессе образования лигнина, который формируется из углеводов через шикимовую кислоту. Вполне возможно, что последующие исследования позволят уточнить и дополнить представленную на схеме 1 последовательность образования ароматических предшественников лигнина, однако то обстоятельство, что эта схема верно отражает основные процессы, протекающие при биосинтезе ароматических соединений в растениях, в настоящее время не вызывает сомнения.

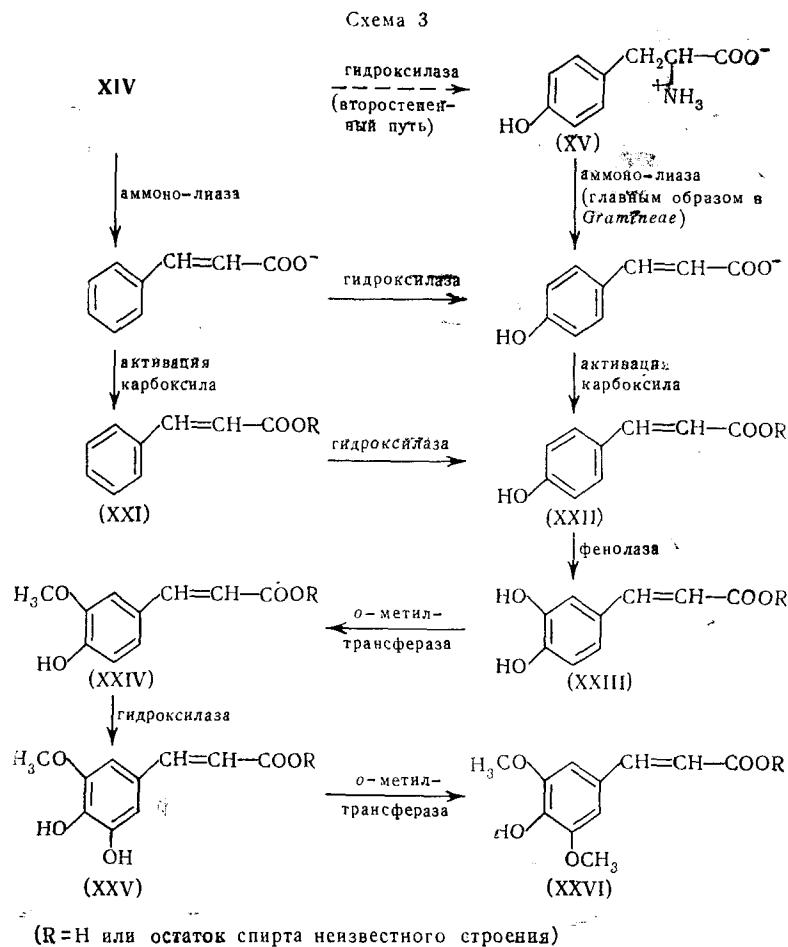
4. Исследования превращения ароматических аминокислот в мономерные предшественники лигнина

Браун и Нейш^{91, 92} провели обширное исследование процесса образования лигнина путем введения в растения меченых фенольных соединений (C_6-C_1 и C_6-C_3), которые рассматривались в качестве потенциальных промежуточных соединений при биосинтезе лигнина. Полученные результаты показали, что фенилаланин (XIV) является эффективным предшественником лигнина в многочисленных растениях, в то время как тирозин (XV) используется для биосинтеза лигнина лишь ограниченным числом видов. Последующие работы Нейша⁹³ и Брауна⁹⁴, которые изучали образование лигнина из ^{14}C -фенилаланина и ^{14}C -тирофина в ряде видов растений, показали, что лишь виды семейства злаковых (*Gramineae*) с одинаковой эффективностью использовали как фенилаланин, так и тирозин. Хотя все виды растений могут включать *p*-кумаровую кислоту (XXII, R=H) в лиггин, злаковые отличаются своей способностью преобразовывать тирозин непосредственно в *p*-кумаровую кислоту, тогда как все другие растения образуют *p*-кумаровую кислоту из фенилаланина через коричную кислоту (XXI, R=H).

Указанный вывод подтвержден исследованиями на ферментативном уровне. Коукол и Конн⁹⁵ показали наличие в шести видах растений фермента, который катализировал деаминирование фенилаланина до коричной кислоты и позднее получил название фенилаланин — аммоно-лиазы. Одновременно Нейш⁹⁶ обнаружил наличие в семи видах трав аналогичного фермента — тирозин — аммоно-лиазы, деаминирующй тирозин до *p*-кумаровой кислоты. Позднее Янг и Нейш⁹⁷ исследовали свойства указанных аммоно-лиаз, выделенных ими из растений пшеницы (*Triticum aestivum*) и орляка (*Pteridium aquilinum*). Кроме того, Нейш и сотр.⁹⁸ провели исследование ряда растений, относящихся к различным видам, и показали, что хотя тирозин — аммоно-лиазу можно обнаружить в других семействах, лишь злаковые содержат наибольшие концентрации этого фермента.

Таким образом, результаты рассмотренных выше исследований свидетельствуют о наличии двух возможных путей образования *p*-кумаровой кислоты: непосредственным действием аммоно-лиазы на тирозин, главным образом в злаковых, или же гидроксилированием коричной кислоты, образующейся в результате деаминирования фенилаланина.

Мак-Калла и Нейш⁴⁶ исследовали последовательность превращений от коричной (XXI, R=H) до синаповой кислоты (XXVI, R=H), подкармливая меченым фенилаланином срезы шалфея (схема 3). Авторы выделили меченные *p*-кумаровую (XXII, R=H), кофейную (XXIII, R=H), феруловую (XXIV, R=H) и синаповую (XXVI, R=H) кислоты, причем изменение скорости включения ^{14}C в каждую кислоту согласуется с последовательностью, приведенной на схеме 3. Кроме того, указанная последовательность подтверждена экспериментами с раздельным введением меченых коричной и других кислот, в результате чего наблюда-



лось быстрое превращение введенного вещества в конечные соединения последовательности и относительно слабое — в первые*. Поскольку трудно предположить, что рассмотренные превращения происходили в растении с несвязанными формами кислот, авторы высказали предположение, что указанные на схеме 3 производные коричной кислоты находятся главным образом в щелочелабильных связанных формах, являющихся, очевидно, сложными эфирами. Позднее Эль-Базиоуни и Нейш^{104, 105} представили более убедительные доказательства участия этих связанных форм, которые они считали растворимыми и нерастворимыми сложными эфирами, в образовании лигнина. Природа этих связанных форм недостаточно ясна, однако полагают, что они либо могут быть связаны с протеиновыми фракциями¹³, либо могут являться сложными эфирами глюкозы^{106–109} или хинной кислоты¹¹⁰.

Отдельные стадии приведенной на схеме 3 последовательности подтверждены исследованиями на ферментативном уровне. Так, Нейр и Вайнинг¹¹¹ выделили из листьев шпината фенилаланин — гидроксилазу,

* Имеются убедительные доказательства деметилирования синаповой^{99–101} и феноловой^{102, 103} кислоты в растениях. Механизм этого процесса пока не установлен.

катализирующую гидроксилирование *L*- β -фенилаланина до тирозина при pH 4,2. Эти же исследователи¹¹² показали наличие в листьях шпината 4-гидроксилазы коричной кислоты, которая катализирует гидроксилирование *транс*-коричной кислоты до *p*-кумаровой. Аналогичный фермент выделили Рассел и Конн¹¹³ из верхушечных почек сеянцев гороха, а Хигути и сотр.¹¹⁴ — из побегов бамбука, спаржи, гинкго и из проростков японского кедра.

Байерум и сотр.¹¹⁵ показали, что в процессе метаболизма в растениях ячменя и табака метильная группа метионина участвует в образовании метоксильных групп лигнина. При помощи меченых соединений авторы доказали, что эта реакция заключается в переносе метильной группы от серы метионина к кислороду в лигнине и таким образом ее можно рассматривать в качестве примера трансметилирования в высших растениях. Позднее было показано, что в растениях табака донором метильной группы при образовании метоксилов лигнина могут быть глицин, сирин и формальдегид¹¹⁶, а в растениях тополя — глицин¹¹⁷. Ряд исследователей^{118—120} установил наличие в травах и древесных кустарниках ферментов, способных метилировать кофейную кислоту в присутствии S-аденозилметионина. Гесс^{121, 122} обнаружил в петуниях и некоторых других растениях аналогичный фермент, который метилирует 5-оксиферуловую кислоту до синаповой кислоты в присутствии аденоцинтрифосфата, метионина или S-аденозилметионина, подтвердив данные, полученные ранее с меченными соединениями¹⁰¹. Хигути и сотр.¹²³ сообщили о выделении из побегов бамбука α -метилтрансферазы, которая катализирует образование феруловой и синаповой кислот. Авторы показали, что активность фермента последовательно увеличивается по мере лигнификации побегов бамбука. Хигути и сотр.¹²⁴ сравнивали специфичность α -метилтрансфераз, экстрагированных из бамбука и тополя (покрытосемянные) и гинкго (голосемянные). Показано, что метилтрансфераза из бамбука и тополя является мета-специфичной для кофейной, 3,4,5-триоксикоричной и 5-оксиферуловой кислот. Скорость образования синаповой кислоты (XXVI, R=H) из 5-оксиферуловой (XXV, R=H) при реакции *in vitro* выше, чем скорость образования феруловой кислоты (XXIV, R=H) из кофейной (XXIII, R=H). С другой стороны, метилтрансфераза из гинкго метилирует только кофейную кислоту и не метилирует 3,4,5-триоксикоричную и 5-оксиферуловую кислоты. Авторы полагают, что обнаруженное различие в специфичности α -метилтрансфераз из голосемянных и покрытосемянных растений является одним из факторов, обуславливающих различия в метаболизме лигнинов у этих групп растений. Следует отметить, что согласно данным Кратцля и Пушмана¹²⁵, метоксилирование ароматического кольца может происходить и на стадии окисления кониферилового спирта.

Вогхен и Батт^{126—128} выделили из листьев шпината содержащий медь препарат фенолазы, который катализировал гидроксилирование *p*-кумаровой кислоты до кофейной. Авторы показали, что этот фермент действует в качестве оксидазы со смешанной функцией (для завершения гидроксилирования необходим как молекулярный кислород, так и донор электронов, например аскорбат, НАД·Н₂ или 6,7-диметил-5,6,7,8-тетрагидроптеридин).

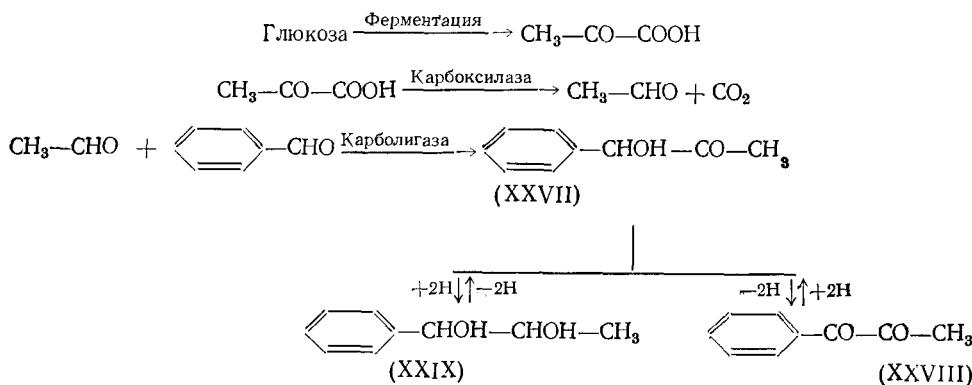
Заключительной стадией биосинтеза мономерных предшественников лигнина является энзиматическое восстановление замещенных в ядре производных коричной кислоты до соответствующих замещенных коричных спиртов. Подобное превращение исследовали Хигути и Браун¹²⁹ для феруловой кислоты. Авторы использовали ¹⁴C-меченный субстрат и показали, что феруловая кислота восстанавливается растениями пшеницы

до кониферилового спирта через образование в качестве промежуточного продукта альдегида. Гросс и Ценк¹³⁰⁻¹³² подтвердили эти превращения исследованиями на ферментативном уровне, выделив из мицелия гриба *Neurospora crassa* соответствующие ферменты. Ранее неизвестная арил-альдегид: НАДФ — оксидоредуктаза (КФ 1.2.1) катализирует восстановление карбоксильных групп ароматических кислот до соответствующих альдегидов. Второй фермент арилкарбинол: НАДФ — оксидоредуктаза (КФ 1.1.1.2), катализирующий обратимое восстановление ароматических альдегидов до ароматических спиртов, отличается от известных спиртовых дегидрогеназ, действуя предпочтительно на первичные ароматические спирты. Авторы отметили широкую специфичность к субстрату у выделенных ферментов и исследовали их свойства. Аналогичные ферменты из высших растений пока не выделены.

5. Возможность иных путей биосинтеза мономерных предшественников лигнина

Хигучи^{50, 133, 134} высказал предположение о том, что соединения с фенилпропановой структурой, являющиеся мономерными предшественниками лигнина, могут синтезироваться в растениях иным, чем рассмотренный выше, путем, а именно в результате $C_6-C_1+C_2$ конденсации, т. е. присоединением C_2 -соединений к производным фенилметана, образующимся из 5-дегидрошикимовой или шикимовой кислот.

Еще в 1921 г. Нейберг и Хирш¹³⁵ обнаружили, что при ферментации сахарозы или пироноградной кислоты в присутствии бензальдегида происходит образование фенилацетилкарбонола (XXVII). Часть образующегося кетола окислялась до бензоилметилкетона (XXVIII), а другая часть, напротив, восстанавливалась до фенилметилэтиленгликоля (XXIX). Авторы предложили следующую последовательность протекающих реакций:



Фермент, который катализировал последнюю реакцию, был назван карболигазой. Позднее Нейберг и сотр.^{136, 137} сообщили, что при действии карболигазы дрожжей на ароматические альдегиды (*o*-хлорбензальдегид, анисовый альдегид и *o*-толуиловый альдегид) происходит образование соответствующих кетолов. В последующие годы образование фенилацетилкарбинола (XXVII) при действии карболигазы дрожжей отмечали и другие исследователи¹³⁸⁻¹⁴⁰.

Поскольку структуры боковых цепей получаемых таким образом кетолов и дикетонов идентичны с продуктами этанолиза лигнина (так на-

зывающие «кетоны Гибберта»), Хигути^{133, 134, 141} предпринял исследование возможности образования фенилпропановых предшественников лигнина в результате реакции, катализируемой карбонилгазой.

Ванилин, сиреневый альдегид и *p*-оксибензальдегид были подвергнуты по отдельности ферментации пивными дрожжами в растворе саха-розы. После ферментации в соответствующих растворах были идентифицированы ванилоилметилкетон, сириноилметилкетон и *p*-оксибензоилметилкетон, причем часть этих соединений восстанавливалась до соответствующих спиртов, а часть окислялась до соответствующих кислот. Полученные дикетоны идентичны некоторым продуктам этанолиза лигнина. Авторы предполагали дальнейшее образование из указанных дикетонов соединений типа фенилацетилкарбинола и бензоилметилкарбинола, хотя существование этих кетолов экспериментально не подтверждено.

Данные ряда исследователей^{134, 141–143} свидетельствуют о наличии C₆—C₁ альдегидов в камбимальном соке многих древесных растений, пшеницы и побегов бамбука. Степанов и Кузин¹⁴⁴ обнаружили карбонилгазу в листьях ряда растений. Помимо этого, Браун и Нейш^{91, 145} сообщили, что при подкормке растений пшеницы мечеными препаратами ванилина и *p*-оксибензойной кислоты, последние вводятся в лигнин пшеницы. Ишикава и Такаичи¹⁴⁶ обнаружили, что при инкубации проросших растений гороха с ванилином и *p*-оксибензальдегидом содержание лигнина в них увеличивается по сравнению с контрольными растениями. Фрейденберг^{147, 148} показал, что меченный ¹⁴C глюкованилин вводится в лигнин молодыми еловыми растениями. Кратцль^{149, 150} сообщил о введении в лигнин меченого *p*-креозола.

Результаты рассмотренных выше исследований позволили Хигути^{50, 133, 134} предположить, что C₆—C₁ альдегиды, образование которых может протекать в растениях различными путями¹⁵¹, в результате реакции, катализируемой карбонилгазой, превращаются в фенилпропанолы. Последние трансформируются далее в результате перегруппировок и дисмутаций аналогично схеме, предложенной Гиббертом^{152, 153} и рассматриваемой в следующей главе.

Заканчивая рассмотрение вопросов, связанных с образованием моно-мерных предшественников лигнина в результате C₆—C₁+C₂ конденсации, наряду с возможностью протекания подобных процессов в растениях следует отметить, что они, по всей вероятности, играют лишь второстепенную роль в ходе биосинтеза лигнина.

6. Роль кониферина в процессе лигнификации

Еще в 1861 г. Хартиг¹⁵⁴ впервые обнаружил в камбимальном соке хвойных древесных пород кониферин, являющийся β -D-глюкозидом кониферилового спирта. В настоящее время показано¹⁵⁵, что кониферин встречается преимущественно в хвойных, представленных шестью семействами и пятнадцатью видами (сиреневый аналог кониферина — сирингин — обнаружен в некоторых лиственных древесных породах). Как будет показано ниже, многие исследователи считали кониферин предшественником лигнина в древесине хвойных, вследствие его очевидной биохимической связи с конифериловым спиртом. Фрейденберг и Биттнер¹⁵⁶ вводили кониферин, синтезированный из меченого ¹⁴C кониферилового спирта, под кору молодых побегов ели. Через два месяца после инъекции более 90% ¹⁴C обнаружено во фракции лигнинов. Позднее Фрейденберг и Нидеркорн¹⁵⁷ показали, что меченный фенилаланин может превращать-

ся как в кониферин, так и в лигнин молодыми побегами ели, на основании чего авторы предположили, что кониферин является промежуточным продуктом при образовании лигнина. Эксперименты Фрёйденберга и сотр.¹⁴⁷, которые подробно рассматриваются ниже, показали, что кониферин гидролизуется β -глюкозидазой до кониферилового спирта, из которого затем происходит построение макромолекул лигнина. Исследования роли кониферина с помощью метода культуры ткани^{158–165} показали стимулирование лигнификации как кониферином, так и сирингином. Кратцль и сотр.^{166–168} провели количественные определения включения кониферина в лигнин ели. Эти исследования показали, что аглюкон кониферина включается в лигнин без перестройки боковой цепи.

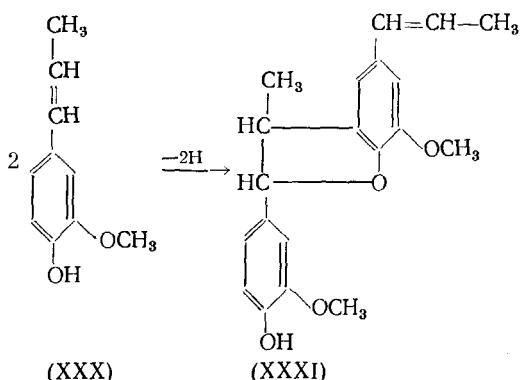
Однако, несмотря на рассмотренные выше исследования, вопрос о роли кониферина в процессе лигнификации все же не может быть решен вполне однозначно. Это связано как с тем, что не наблюдается повсеместного распространения кониферина, так и с тем, что в процессе лигнификации не всегда может быть обнаружена β -глюкозидаза¹⁵⁰.

III. ИССЛЕДОВАНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ ЛИГНИНА ИЗ МОНОМЕРНЫХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ

Рассмотренные в предыдущей главе исследования по обнаружению в растениях различных энзиматических систем, катализирующих отдельные стадии биосинтеза мономерных предшественников лигнина, а также эксперименты с различными мечеными соединениями, проводились главным образом *in vivo*, т. е. с растениями или с культурами ткани. Исследования, которые будут рассмотрены в настоящей главе, в основном, представлены экспериментами *in vitro*. Этот метод обладает как рядом значительных преимуществ, так и существенными недостатками, которые будут рассмотрены в процессе изложения.

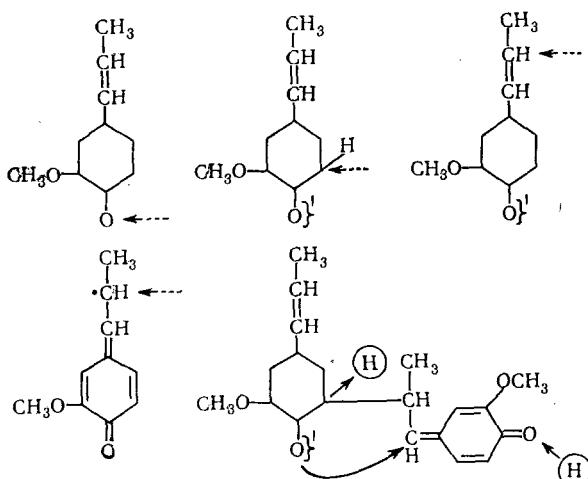
1. Краткий исторический обзор работ по биосинтезу лигнина *in vitro*

В 1875 г. после установления строения глюкозида кониферина, присущего в камбимальном соке хвойных в период вегетации, Тиман и Мендельсон¹⁶⁹ высказали предположение о наличии определенной генетической связи между кониферином и лигнином. В 1897 г. Класон¹⁷⁰ использовал эту идею в своих работах по химии лигнина и предположил, что лигнин представляет собой продукт конденсации или полимеризации кониферилового спирта, образующегося в растении при энзиматическом гидролизе кониферина. Позднее Класон^{171–178} рассматривал лигнин в качестве продукта конденсации кониферилового альдегида, образующегося в результате окисления кониферилового спирта. В 1908 г. французские химики Кузен и Геррисей^{179, 180} обнаружили, что при дегидрировании изоэвгенола (XXX) наряду с другими соединениями образуется кристаллический продукт, который, согласно аналитическим данным, состоит из двух молекул эвгенола. Авторы дегидрировали изоэвгенол спиртовым раствором FeCl_3 или дегидрогеназами сока грибов *Russula delica* в присутствии кислорода и в обоих случаях получили одинаковый продукт. Согласно предположению Кузена и Геррисея, этот продукт, названный дегидродизоэвгенолом, является бифенильным производным. Лишь в 1933 г. Эрдтман^{181, 182} доказал истинное строение дегидродизоэвгенола, показав, что он обладает фенилкумарановой структурой (XXXI).



Эрдтман¹⁸² предложил механизм дегидрополимеризации изоэвгенола в дегидридоизоэвгенол через промежуточное образование кислородного радикала*. Этот механизм приводится на схеме 4 в изображении автора¹⁸².

Схема 4

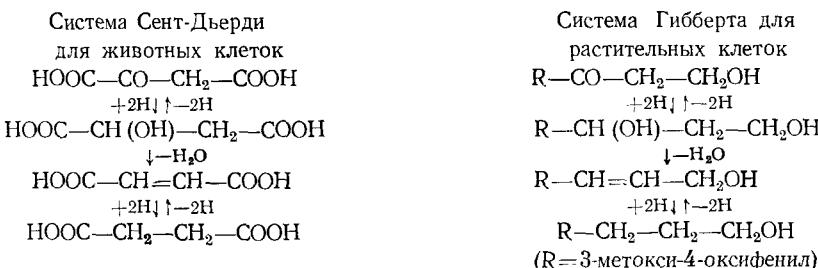


Согласно предположению Эрдтмана, образование дегидридоизоэвгенола можно рассматривать в качестве модели биосинтеза лигнина в растениях, который осуществляется в результате дегидрополимеризации гвяцилпропановых производных, содержащих кислород в боковых цепях. Выдвинутая Эрдтманом гипотеза явила исходным пунктом всех последующих исследований по биосинтезу лигнина, которые будут рассмотрены ниже.

Выделение и идентификация различных мономерных продуктов этаполиза древесины («кетоны Гибберта») позволило Гибберту^{152, 153} в 1941 г. выдвинуть так называемую дисмутационную гипотезу. Согласно этой гипотезе, катализаторами дыхания растительных клеток являются вещества типа кониферилового спирта, которые выполняют функции переносчиков водорода. Окислительно-восстановительная система в растительных клетках, согласно предположению Гибберта, аналогична системе

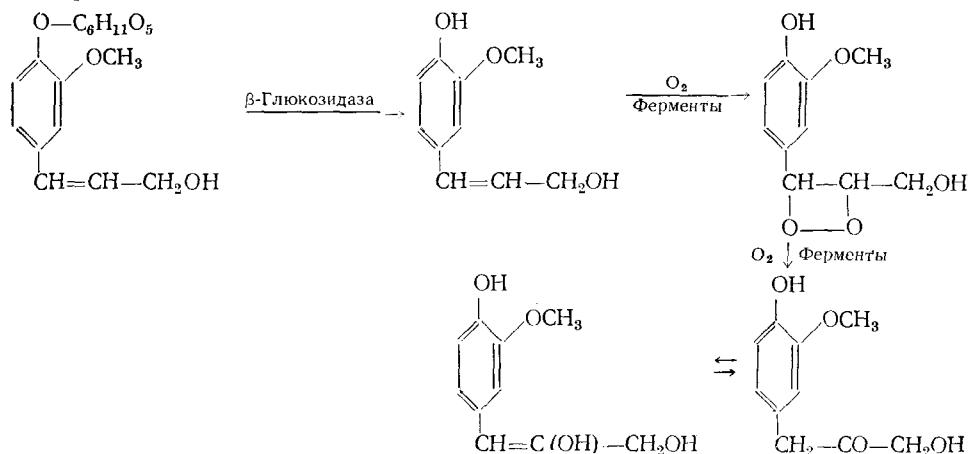
* Следует отметить, что представление о радикальном характере дегидрирования фенолов, получившее впоследствии широкое распространение в органической химии и биохимии, впервые было выдвинуто в работах Пуммерера¹⁸³⁻¹⁸⁶.

ме, предложенной Сент-Дьерди¹⁸⁷ для животных клеток, что очевидно из приводимой ниже схемы:



Таким образом, согласно гипотезе Гибберта, мономерные фенилпропановые соединения синтезируются растениями для выполнения функции дыхательных катализаторов. У высших растений в постмортальном состоянии клеток эти соединения окисляются и легко подвергаются различным превращениям (дегидрогенизация, конденсация, полимеризация), приводящим к образованию лигнина. Гипотеза Гибберта позднее нашла свое развитие в исследованиях Манской.

В 1947 г. Манская^{188, 189} провела исследование окислительных процессов в древесине в связи с лигнинообразованием. Она показала, что камбимальная ткань и древесина нового годичного слоя сосны содержат окислительные ферменты: пероксидазу и полифенолоксидазу, причем субстратом для этих ферментов служат кониферин и его производные. Манская указала на равновесие окислительно-восстановительных процессов в камбимальной ткани, вследствие чего в клетках не происходит накопления продуктов окисления фенолов. При отмирании живых клеток в процессе одревеснения окислительные процессы начинают резко преобладать над восстановительными, и продукты окисления полифенолов начинают отлагаться в виде лигнина. Отложение лигнина, согласно гипотезе Манской, непосредственно связано с нарушением работы дыхательного аппарата в растительных клетках. Согласно этой гипотезе, окисление кониферилового спирта в древеснеющих клетках можно представить следующей схемой:



Продукты, полученные в результате ферментативного окисления, превращаются путем дальнейшего уплотнения в лигнин, отлагаемый в клеточных стенках древесины. Результаты проведенного Манской¹⁹⁰ исследования изменений активности пероксидазы в камбимальной заболони и

прилегающем слое древесины, а также соответствующих изменений в содержании кониферина показали, что в период наивысшей энзиматической активности содержание кониферина было самым низким и наоборот. Результаты этого исследования послужили основанием для вывода о том, что кониферин служит субстратом для ферментов. Позднее Манская и Бардинская¹⁴² окисляли конифериловый спирт пероксидазой (из прикамбимального слоя сосны) или полифенолоксидазой (из одревесневшей центральной части корня сахарной свеклы) и получили полимерные соединения, которые по элементарному составу и содержанию функциональных групп, молекулярному весу и данным УФ-спектроскопии были близки препаратам Фрейденберга, полученным из кониферилового спирта действием ферментов из шампиньонов.

При рассмотрении вопросов биосинтеза лигнина основное внимание следует уделить работам Фрейденберга и его сотрудников по получению и исследованию биосинтетического лигнина. Многолетние исследования этих ученых, проведенные на высоком экспериментальном уровне, внесли значительный вклад в химию лигнина, дав информацию не только о возможных путях его биосинтеза, но также и о строении этого сложного полимерного вещества.

В 1943 г. Фрейденберг и Рихтзенхайн¹⁹¹, а позднее Рихтзенхайн¹⁹²⁻¹⁹⁴ наблюдали образование полимерных лигниноподобных материалов при действии на различные мономерные фенольные производные гвяцилового и сиреневого ряда неочищенных ферментов гриба *Psalliota campestris*. На основании полученных данных авторы пришли к заключению, что лигнин образуется в результате энзиматического дегидрирования замещенных производных фенола, подтвердив тем самым выдвинутую ранее гипотезу Эрдтмана.

В 1949 г. Фрейденберг^{195, 196} сообщил о получении биосинтетического лигнина, названного им дегидрополимером (ДГП). Этот препарат был получен при действии ферментов из сока шампиньонов (*Psalliota campestris*) на конифериловый спирт при нейтральном рН, 20° и аэрации в течение трех суток. Выход ДГП составил 93% от исходного кониферилового спирта. Полученный полимер был весьма близок к лигнину, выделенному из еловой древесины, по таким важным характеристикам, как растворимость, элементарный состав и содержание функциональных групп, выход формальдегида при перегонке с 28%-ной H_2SO_4 , выход ароматических кислот при метилировании, сплавлении со щелочью, повторном метилировании и окислении $KMnO_4$, цветные реакции, УФ-спектры и т. д. Указанная работа явилась началом обширного цикла исследований по энзиматическому дегидрированию кониферилового спирта. Позднее Фрейденберг и его сотрудники исследовали принципы биосинтеза лигнина *in vitro*, изучали процесс дегидрирования кониферилового спирта путем выделения промежуточных продуктов, расширили исследования в направлении сравнения свойств ДГП и лигнина еловой древесины.

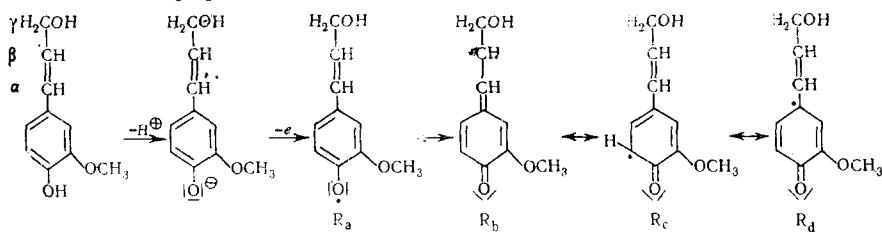
В 1963 г. Фрейденберг и Харкин¹⁹⁷ сообщили, что в камбимальном соке ели в период вегетации наряду с кониферином найдены небольшие количества *p*-глюокумарового спирта и сирингина. В соответствии с этим Фрейденберг и сотр.¹⁹⁸⁻²⁰⁰ для получения биосинтетического лигнина, наиболее близкого к лигнину хвойных, дегидрировали смесь *p*-кумарового, кониферилового и синапового спиртов в молярном отношении 14 : 80 : 6.

Вряд ли целесообразно рассматривать работы Фрейденберга и его сотрудников в исторической последовательности, которая, хотя и дает представление об эволюции взглядов автора на строение и биосинтез лигнина *in vitro*, с трудом позволяет составить представление о современ-

ном состоянии указанной проблемы. В связи с этим в последующих разделах мы остановимся на главных направлениях проведенных Фрейденбергом исследований и на основных его выводах, которые легли в основу современных представлений о биосинтезе лигнина.

2. Механизм полимеризации кониферилового спирта

Согласно представлениям Фрейденберга^{199, 201, 202 *}, полимеризация кониферилового спирта происходит по радикальному механизму. В ходе исследования энзиматического дегидрирования кониферилового спирта Фрейденберг и сотр.^{201, 203–205} установили, что если прервать действие дегидрогеназ шампиньонов или камбия на водный раствор кониферилового спирта, как только последний перестает обнаруживаться в реакционной смеси, можно выделить промежуточные продукты дегидрирования — димеры. В результате экстракции реакционной смеси хлористым метиленом или *n*-бутанолом были выделены и затем идентифицированы дегидродиконифериловый спирт²⁰³, *D*, *L*-пинорезинол²⁰⁴ и β -конифериловый эфир гвайцилглицерина²⁰¹. На основании строения этих промежуточных продуктов биосинтеза лигнина *in vitro*, а также гипотезы Эрдтмана о радикальном характере образования лигнина, Фрейденберг предложил схему превращений кониферилового спирта в процессе его энзиматического дегидрирования:



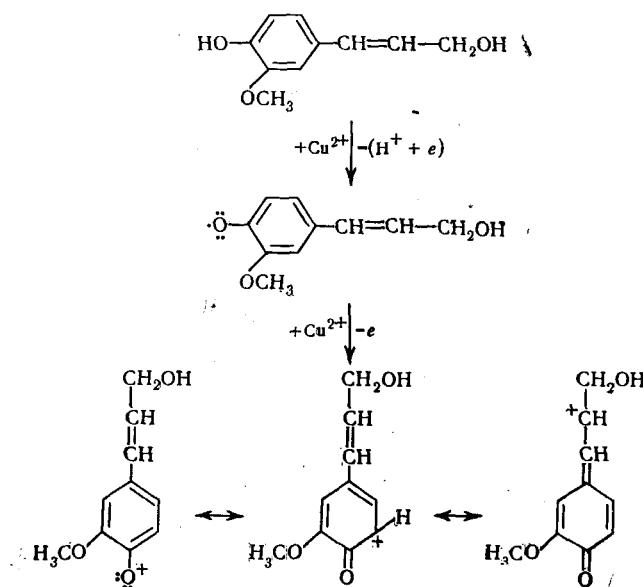
Согласно приведенной схеме, в процессе энзиматического дегидрирования молекула кониферилового спирта теряет водородный атом фенольного гидроксила, образуя ароксильный радикал R_a . Этот радикал может существовать в любой из указанных мезомерных форм ($R_a = R_d$). Фрейденберг и сотр.²⁰⁶ установили, что полупериод жизни этих мезомерных форм в смеси: диоксан : вода (1 : 1 по объему) составляет 45 сек. Мезомерные формы образовавшегося радикала далее комбинируются между собой и претерпевают различные превращения, подробно рассматриваемые в следующем разделе, которые и приводят в конечном итоге к образованию биосинтетического лигнина (ДГП). Необходимо подчеркнуть, что согласно данным Фрейденберга^{207–209}, реакция дегидрирования кониферилового спирта не является специфической, поскольку она может инициироваться различными реагентами: лакказой, выделенной из сока шампиньонов, в присутствии кислорода воздуха; пероксидазой хрена в присутствии H_2O_2 ; лакказой и пероксидазой, выделенными из прикамбильного слоя еловой древесины; рядом неорганических агентов (соли окиси меди, MnO_2 , двуокись свинца); а также, например, 2,4,6-три-*тритибутил*-феноксилом и т. д.

Помимо рассмотренного выше радикального механизма полимеризации кониферилового спирта, следует остановиться на предложенном Ад-

* Поскольку исследования Фрейденберга легли в основу его многочисленных публикаций, отражающих эволюцию представлений автора, в каждом случае ссылки включают как первую публикацию по указанному вопросу, так и последние работы, в которых содержатся современные представления автора.

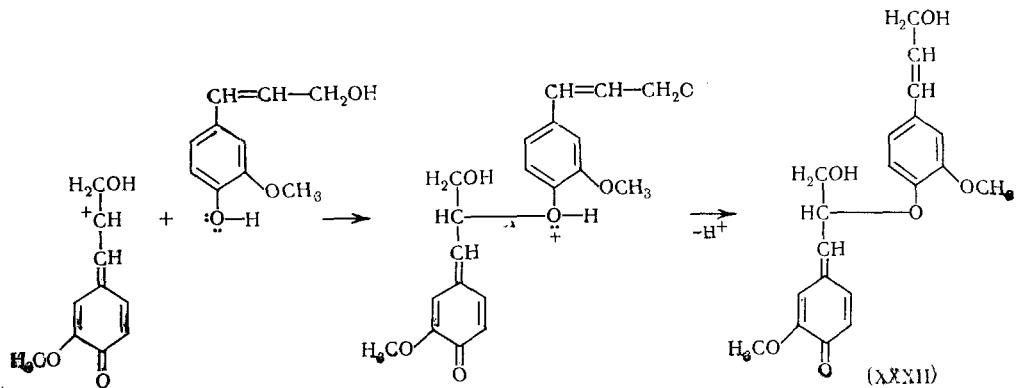
лером ²¹⁰ ионном механизме (схема 5). Согласно представлениям Адлера,

Схема 5



начальная реакция является радикальной и осуществляется без переноса электрона. Предполагаемый последующий «одноэлектронный перенос», в результате которого от первоначально образовавшегося радикала отделяется неспаренный электрон, может осуществляться либо энзиматически, либо без участия ферментов, катализируясь Cu^{2+} или Fe^{3+} .

Образовавшийся таким образом мезомерный катион может реагировать с конифериловым спиртом, в результате чего происходит образование димерного хинонметида (XXXII). Как будет показано ниже, образование этого хинонметида можно представить и в результате комбинации мезомерных форм R_a и R_b ²⁰¹.

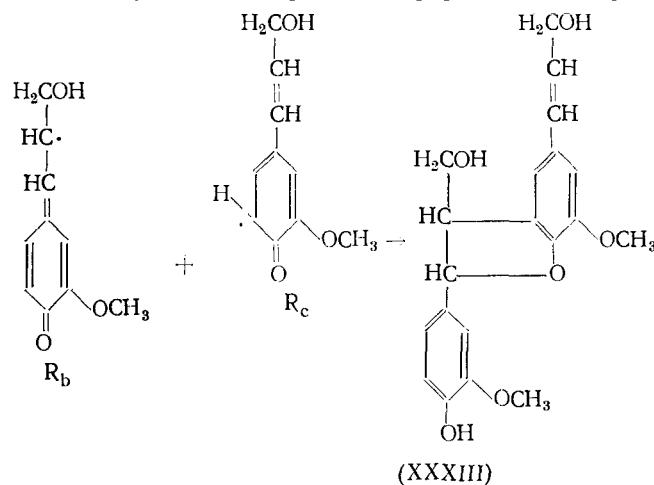


3. Принципы роста молекулы ДГП и основные промежуточные продукты, выделяемые в процессе образования биосинтетического лигнина

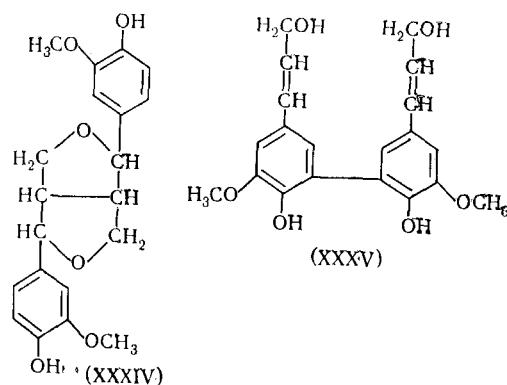
Как установил Фрейденберг²¹¹, путем разрушения ферментов действием NaCN удается прервать энзиматическое дегидрирование кониферилового спирта на любой стадии с целью последующего выделения проме-

жуточных продуктов биосинтеза лигнина *in vitro*. Лучший выход низкомолекулярных промежуточных продуктов дегидрирования кониферилового спирта получен после удаления примерно одного атома водорода от каждой молекулы исходного карбинола. При удалении больших количеств водорода образуются нерастворимые в воде продукты с высоким молекулярным весом. Полученные таким образом промежуточные продукты биосинтеза лигнина *in vitro* разделяли методом хроматографии на бумаге. После обработки хроматограмм диазобензолсульфокислотой обнаружено наличие ~ 40 пятен²¹². Фрейденбергу и сотр.^{4, 213} удалось выделить и затем идентифицировать ряд димерных, тримерных и олигомерных промежуточных соединений. По предложению Фрейденберга²¹⁴, эти промежуточные соединения обычно называют лигнолами.

Как отмечалось в предыдущем разделе, Фрейденберг полагает, что дилигнолы образуются в результате комбинации мезомерных форм $R_a - R_d$ ароксильного радикала, получаемого в результате энзиматического дегидрирования кониферилового спирта. Так, путем комбинации форм R_b и R_c образуется дегидродиконифериловый спирт (XXXIII)²⁰³.



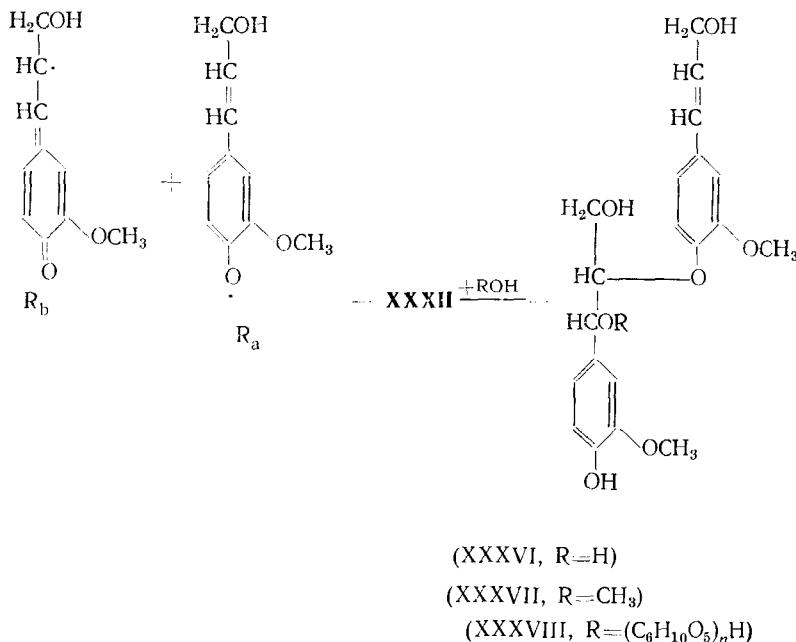
Аналогичным примером стабилизации двух мезомерных форм R_b за счет димеризации может служить образование *D*, *L*-пинорезинола (XXXIV)²⁰⁴, а также образование дегидро-бис-кониферилового спирта (XXXV)²¹¹ в результате комбинации двух мезомерных форм R_c :



Согласно представлениям Фрейденберга^{208, 215}, важная роль в дальнейшем биосинтезе лигнина отводится хинонметиду (XXXII), образующемуся в результате комбинации мезомерных форм R_a и R_b ²⁰¹. Следует отметить, что структура хинонметида, первоначально предложенная в качестве гипотетической, затем получила подтверждение на основании результатов УФ-спектральных измерений²¹⁶. Одновременно установлено, что период полураспада хинонметида в смеси диоксан:вода (1:1 по объему) при 20° составляет ~ 60 мин. Указанный хинонметид нестабилен и не может стабилизироваться путем внутримолекулярной перегруппировки. Вследствие этого он стабилизируется интрамолекулярно, присоединяя элементы воды или других диссоциированных гидроксилсодержащих соединений, если это позволяют стерические условия. Присоединение воды к хинонметиду приводит к образованию β -кониферилового эфира гвайцилглицерина (XXXVI)²⁰¹, составляющему вместе с дилигнолами (XXXIII) и (XXXIV) основную часть димерных промежуточных соединений. Интересно отметить, что эти три главные дилигнолы биосинтеза лигнина *in vitro* Фрейденберг и Харкин¹⁹⁷ обнаружили также в камбальном соке ели.

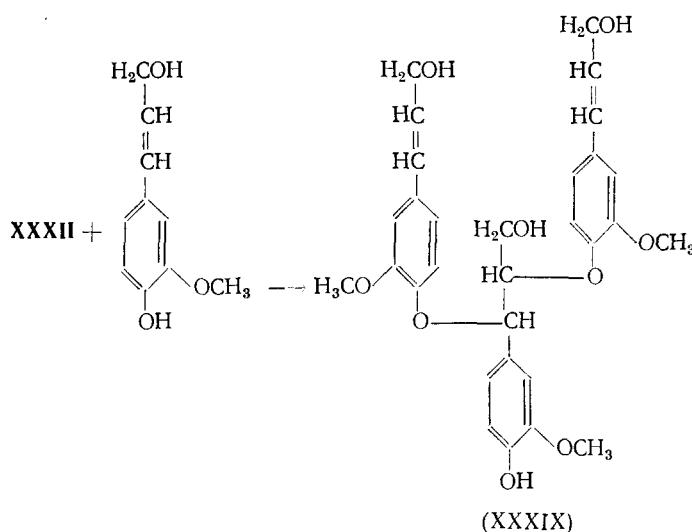
При проведении энзиматического дегидрирования кониферилового спирта в водном растворе, содержащем 30% CH_3OH , образуется α -метил- β -конифериловый эфир гвайцилглицерина (XXXVII)²⁰⁸, а при проведении той же реакции в водном растворе, содержащем 66% сахараозы, образуется соответствующий эфир сахара (XXXVIII)^{208, 217}. Эту бензилэфирную связь Фрейденберг рассматривает как один из наиболее вероятных типов лигноуглеводной связи в растительных тканях.

Поскольку рассмотренные дилигнолы также являются фенолами, они могут претерпевать дальнейшее энзиматическое дегидрирование, причем вновь образующиеся димерные радикалы могут комбинироваться как между собой, так и с мезомерными формами R_a — R_a . В результате подобных превращений образуются трилигнолы, тетралигнолы и последующие олиголигнолы. Ряд указанных олигомерных соединений выделили и идентифицировали Фрейденберг и сотр.²¹⁸⁻²²⁴.

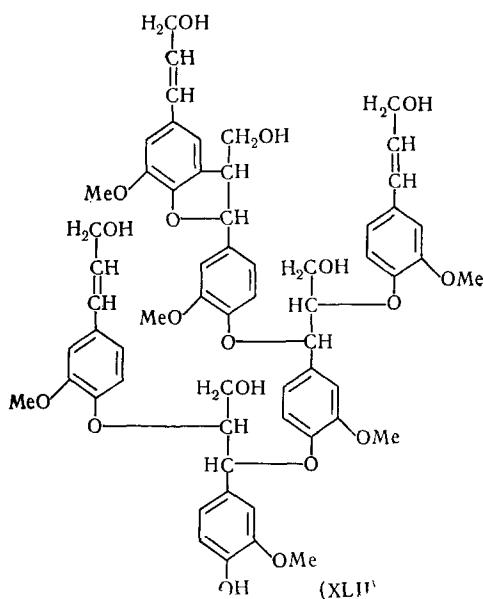
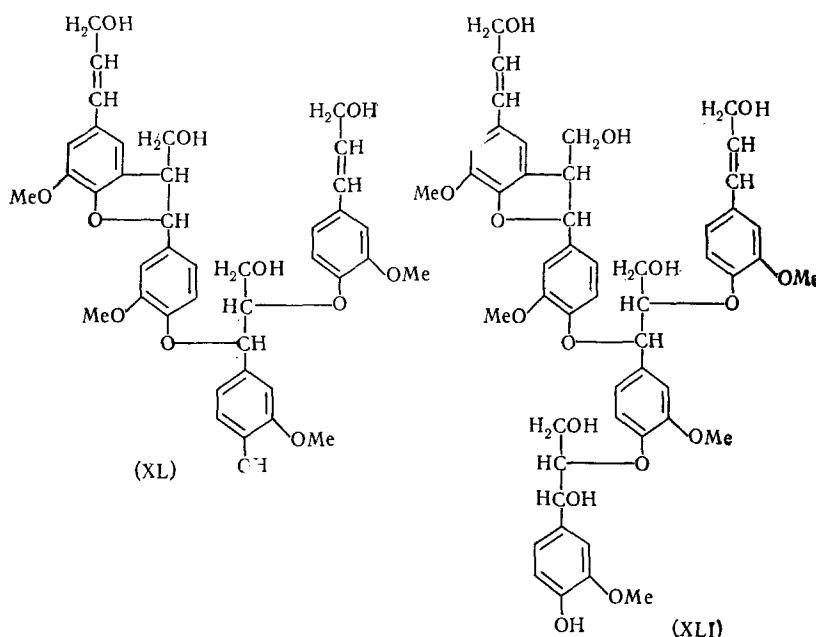


На основании идентифицированных промежуточных продуктов биосинтеза лигнина из кониферилового спирта *in vitro* Фрейденберг^{202, 212, 225, 226} сформулировал основные принципы роста молекулы ДГП.

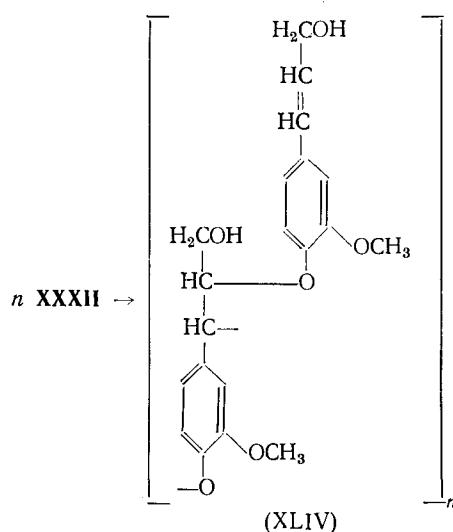
Первый принцип заключается в продолжающемся дегидрировании олиголигнолов, которое приводит к образованию новых ароксильных радикалов, претерпевающих различные рекомбинации. Однако, в том случае, если бы рост молекулы ДГП протекал исключительно за счет дегидрирования, каждая структурная единица должна была бы терять 2 атома Н, к которым следует прибавить потерю еще ~0,4 атомов Н за счет образования карбонильных групп $(-\text{C}=\text{O})$, т. е. всего 2,4. На самом деле имеет место максимальная потеря примерно 2 атомов Н²²⁷, из которых каждая структурная единица ДГП теряет в среднем 1,7—1,8 атомов Н за счет образования связей и 0,2—0,3 атома за счет образования карбонильных групп. Таким образом, количество водорода, отщепление которого приводит к конденсации, составляет 1,7—1,8 атома на структурное звено, что недостаточно для образования больших молекул. Другими словами, примерно на каждые четыре структурных элемента, связанных за счет потери водорода, приходится связь, образованная за счет присоединения или полимеризации и не связанная с потерей водорода. Это указывает на существование других принципов роста макромолекулы лигнина. В этом отношении ключевую роль играет хинонметид (XXXII), способный присоединять фенолы без дополнительной потери водорода. Простейшим примером второго принципа роста макромолекулы ДГП является присоединение кониферилового спирта к димерному хинонметиду (XXXII), в результате чего образуется трилигнол — бензилариловый эфир (XXXIX)²¹⁸.



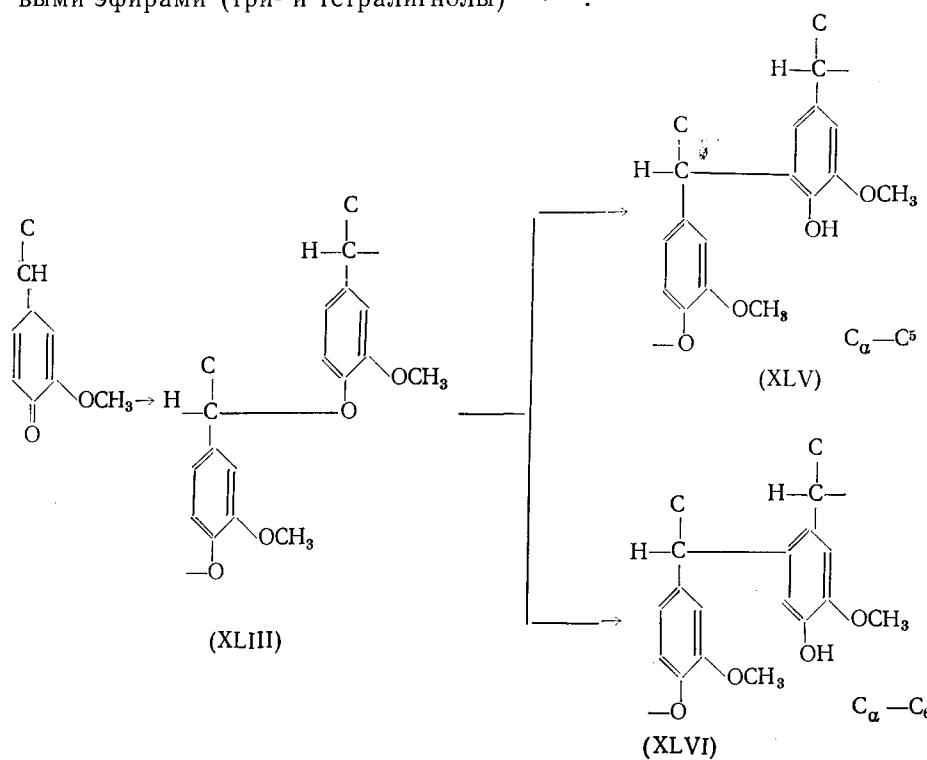
Указанный принцип роста можно также проиллюстрировать на примере образования тетралигнола (XL) (аддукт дегидродикониферилового спирта и хинонметида²¹⁸), пенталигнола (XLI) (аддукт трилигнола и хинонметида)²²⁴ и гексалигнола (XLII) (аддукт тетралигнола и хинонметида)²²⁴.



В конкуренции с присоединением фенолов к хинонметидам протекает процесс полимеризации *p*-хинонметидов, приводящий к образованию цепей бензилариловых эфиров (XLIII)²²⁸. Так, например, соединение (XLIV) является продуктом полимеризации хинонметида (XXXII). Этот процесс рассматривается в качестве третьего принципа роста молекулы ДГП.



Наконец, четвертым принципом роста молекулы ДГП является перегруппировка α -ариловых эфиров, приводящая к образованию производных дифенилметана^{222, 228}. Этот процесс имеет место при длительном действии очень разбавленных кислот (аналогичные условия создаются клеточным соком растений). Эфир (XLIII) в результате конденсации между C_α первого звена и пятым углеродным атомом в кольце второго с одновременной регенерацией фенольной гидроксильной группы второго звена превращается в структуру (XLV). Аналогичная конденсация C_α -атома может происходить в меньшей степени с 6-м атомом С второго звена и в еще меньшей степени со 2-м углеродным атомом. Указанная перегруппировка α -ариловых эфиров имеет место не только в случае полимеров, но наблюдалась также и с простыми гваяцилглицерин- α -ариловыми эфирами (три- и тетрагликоли) ^{222, 226}.



Не регулируемый ферментами процесс рекомбинации различных мезомерных форм ароксильного радикала, образовавшегося при дегидрировании кониферилового спирта, приводит к тому, что синтезируемые как *in vivo*, так и *in vitro* полилигнолы не обладают оптической активностью, несмотря на наличие в них асимметрических центров^{205, 215}.

4. Химические и физические свойства дегидрополимеров и их сравнение со свойствами лигнина механического размола

В табл. 1 приведены полуэмпирические «формулы», рассчитанные на структурное звено лигнина $C_6 - C_3$, для различных препаратов ДГП и лигнина механического размола (ЛМР), выделенного из еловой и буковой древесины по методу Бьеркмана^{229, 230}. Приведенные данные свидетельствуют о близости химического строения соответствующих полимеров.

ТАБЛИЦА 1

Полуэмпирические «формулы» некоторых препаратов биосинтетического и природного лигнинов (согласно данным¹⁹⁸)

Препарат	Полуэмпирическая «формула»*	Потеря водорода	Прирост воды
ДГП из <i>p</i> -кумарового спирта	$C_9H_{8,75}O_2(H_2O)_{0,30}$	1,25	0,30
ДГП из кониферилового спирта	$C_9H_{7,49}O_2(H_2O)_{0,28}(OCH_3)_{1,01}$	1,51	0,26
ДГП из <i>p</i> -кумарового и кониферилового спиртов (1:4)	$C_9H_{7,76}O_2(H_2O)_{0,28}(OCH_3)_{0,83}$	1,44	0,28
ДГП из <i>p</i> -кумарового, кониферилового и синапового спиртов (14:80:6)	$C_9H_{7,64}O_2(H_2O)_{0,31}(OCH_3)_{0,92}$	1,44	0,31
ЛМР из еловой древесины	$C_9H_{7,78}O_2(H_2O)_{0,40}(OCH_3)_{0,91}$	1,30	0,40
ЛМР из буковой древесины	$C_9H_{8,28}O_2(H_2O)_{0,41}(OCH_3)_{1,36}$	2,36	0,41

* В «формулах» лигнинов для большей наглядности приведено количество кислорода, соответственно его содержанию в исходном спирте (2 атома на $C_6 - C_3$). Избыток кислорода выделен в виде воды.

тельствуют о близости ЛМР из еловой древесины и ДГП, полученного в результате энзиматического дегидрирования смеси кониферилового, *p*-кумарового и синапового спиртов.

К приведенным в табл. 1 данным можно добавить, что для ЛМР из еловой древесины и ДГП, полученного энзиматическим дегидрированием кониферилового спирта, общее содержание гидроксильных групп, определенное по методу Верлея, составляет в обоих случаях 1,2—1,4 моля (*M*) на $C_6 - C_3$ ^{230, 231}, из которых 0,30—0,35 *M* являются фенольными (методом потенциометрического титрования в неводной среде^{227, 232}); содержание карбонильных групп, определенное гидроксиламинным методом, составляет 0,20 *M* на $C_6 - C_3$ для ЛМР²³⁰ и 0,15 *M* для ДГП²³¹.

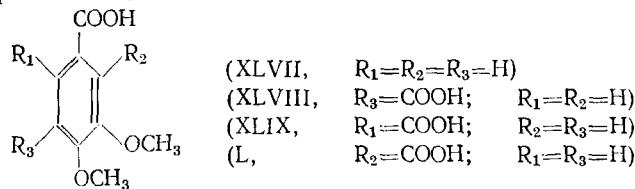
Интересно отметить, что молекулярные веса препаратов как биосинтетического лигнина, так и лигнина, выделенного из древесины ели методом механического размола, находятся в пределах 6000—10000^{209, 230}. Аналогичны также и результаты спектрального исследования рассматриваемых препаратов. ИК-спектры ЛМР и ДГП совпадают, за исключением некоторых деталей, обусловленных тем, что указанные препараты несколько отличаются по содержанию карбонильных групп ($\nu = 1710 - 1740 \text{ cm}^{-1}$) и этиленовых двойных связей ($\nu = 970 \text{ cm}^{-1}$)^{233—235}. УФ-спектры обоих препаратов аналогичны по расположению максимумов и минимумов,

В то же время экстинкция в случае биосинтетического лигнина в 1,2—1,3 раза выше. Однако после выдерживания ДГП в 0,1 N минеральной кислоте при 20° в течение недели величина экстинкции биосинтетического лигнина становится такой же, как и у природного лигнина^{209, 236}. Наконец, как показали Фрейденберг и Харкин²³⁷, оба препарата содержат небольшие количества свободных радикалов. По данным ЭПР, их концентрация в ЛМР из еловой древесины составляет $2,3 \cdot 10^{16}$ спин/г, а в биосинтетическом лигнине из кониферилового спирта — $2,15 \cdot 10^{16}$ спин/г.

Продукты, полученные при взаимодействии как ДГП, так и лигнина еловой древесины с тиогликолевой кислотой обладали одинаковым элементарным составом¹⁹⁶. Это относится также и к продуктам метилирования ДГП и лигнина еловой древесины как диметилсульфатом и щелочью, так и диазометаном²³⁸, а также к лигносульфонатам аммония, полученным из еловой древесины и ДГП¹⁹⁶.

Убедительные доказательства близкого сходства природного и биосинтетического лигнинов получены при реакциях расщепления. Так, при обработке этих препаратов в одинаковых условиях горячей щелочью, последующем метилировании диметилсульфатом и окислении метилированных продуктов перманганатом ЛМР и ДГП из смеси кониферилового, *p*-кумарового и синапового спиртов дают более 20 так называемых деградационных кислот, главным образом метоксибензолкарбоновых кислот с общим выходом для идентифицированных продуктов ~18% от теоретического^{198, 214}. Основным продуктом при окислении метилированных лигнинов является вератровая кислота (XLVII), на долю которой приходится около половины суммарного выхода. Остальные кислоты обнаружены в незначительных количествах. Как показали Фрейденберг и сотр.^{198, 214}, количественное соотношение и типы образующихся при окислении обоих препаратов лигнина кислот одинаковы.

Интересно отметить, что при получении биосинтетического лигнина из 5-дайтерокониферилового спирта потеря дайтерия составила 45%²³⁹. При дегидрировании в условиях получения ДГП 6-дайтероконифериловый спирт теряет 8—10% дайтерия, а 2-дайтероконифериловый спирт — 2—4%²⁴⁰. Эти величины указывают на относительное участие различных положений ароматического ядра в образовании внутримолекулярных С—С-связей лигнина, причем указанное соотношение реакционных положений 5, 6 и 2 (45:9:3) приблизительно соответствует количественному соотношению выходов изогемипиновой (XLVIII), метагемипиновой (XLIX) и гемипиновой (L) кислот в продуктах окислительной деструкции метилированных ДГП и ЛМР²¹⁴:



При расщеплении биосинтетического лигнина, полученного из $[\beta\text{-}^{14}\text{C}]$ -кониферилового спирта, образующаяся изогемипиновая кислота (XLVIII) обладает 49—52% удельной активности исходного спирта, а на долю метагемипиновой кислоты (XLIX) приходится 10,5% удельной радиоактивности²⁴¹. Изогемипиновая и метагемипиновая кислоты, выделенные из продуктов окислительной деструкции лигнина, образовавшегося в молодых побегах ели после введения аналогично меченого фенилаланина²⁴² или кониферина²⁰⁶, обладают той же активностью в отношении активности исходных лигнинов (53 и 12% соответственно).

При нагревании с 28%-ной серной кислотой выход формальдегида составляет в случае ЛМР 1,1%, а в случае ДГП — 1,4%²⁰⁹. И наконец, выход ванилина при нитробензольном окислении обоих препаратов одинаков и составляет 25% от исходного лигнина²⁰⁹.

Таким образом, рассмотренные выше данные убедительно свидетельствуют о близком сходстве природного (ЛМР) и биосинтетического (ДГП) лигнинов в отношении ряда важных химических и физических свойств.

5. Схема строения фрагмента лигнина

Рассмотренные выше данные по биосинтезу лигнина *in vitro* (промежуточные соединения, соотношение основных дилигнолов, четыре принципа роста) наряду с данными химического анализа елового лигнина, выделенного по методу Бьёркмана (элементарный состав, количество и типы гидроксильных групп, соотношение трех исходных мономерных спиртов, содержание карбонильных групп и т. д.), и результатами экспериментов по полимеризации меченого ¹⁴C кониферилового спирта легли в основу сконструированной Фрейденбергом схематической структурной формулы фрагмента лигнина. Предложенный в 1961 г. первый вариант²⁴³ впоследствии несколько раз модифицировался автором^{220, 226, 237}. Последняя схема, представленная Фрейденбергом на Международном симпозиуме в Гренобле²²⁵, состоит из 18 звеньев и соответствует составу дегидрополимера, полученного дегидрированием *in vitro* очень разбавленной смеси 14 M *p*-кумарового, 80 M кониферилового и 6 M синапового спиртов при действии дегидрогеназы лакказы.

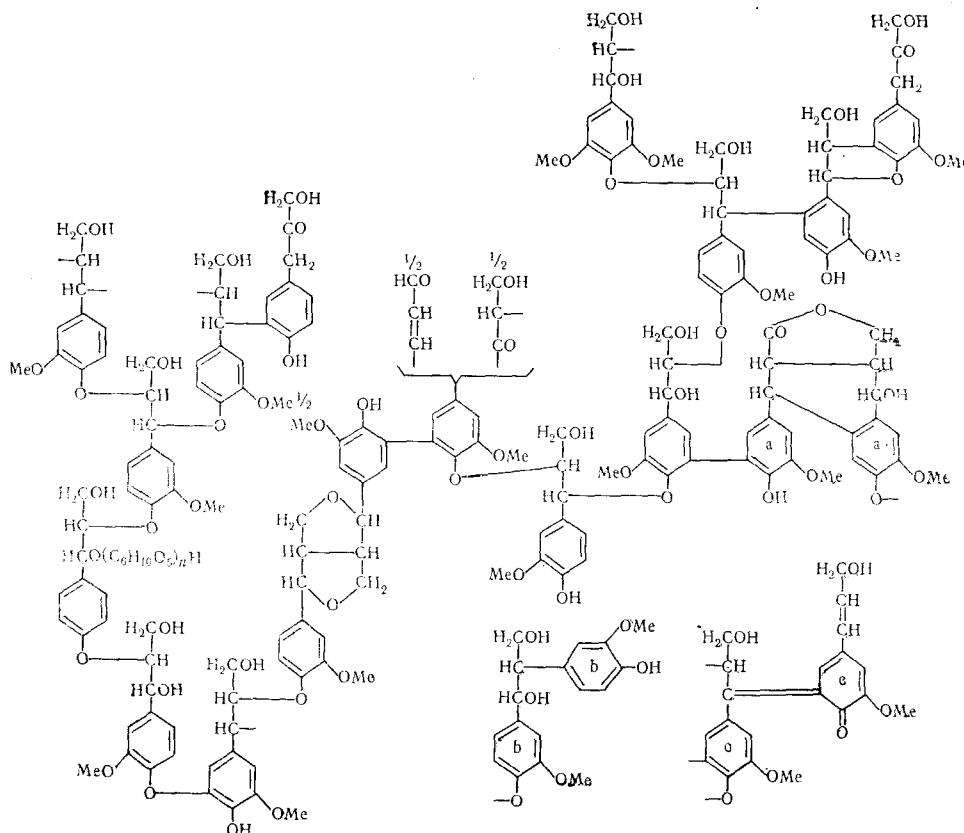


ТАБЛИЦА 2

Некоторые характеристики лигнина ели в сравнении с теми же данными, рассчитанными на основании схемы фрагмента лигнина* (согласно данным²⁴⁷)

Характеристика	Найдено или рассчитано для лигнина ели	Предсказано на основании схемы фрагмента лигнина
Звенья, способные вступать в реакцию с тиогликолевой кислотой (α -эфир, α -карбинол, фенилэтилен, карбонил)	0,8	0,8
Образование лигносульфоновой кислоты**:		
Группа X \downarrow A	0,15	0,17
Группа Z \downarrow	0,15	0,20
Группа В	0,30	0,28
В сумме	0,60	0,65
Звенья, способные отщеплять метанол (0,5% HCl, 20°)	0,62	0,72
Звенья, способные отщеплять метанол, после обработки NaBH ₄	0,42	0,44
Конденсация у C ₅	0,45	0,42
Конденсация у C ₆	0,08	0,07
Конденсация у C ₂	0,04	
Звенья, участвующие в бифенильных связях	0,25—0,30	0,22
Звенья, способные образовывать кетоны Гибберта	0,1	0,17
Звенья, способные образовывать ванилин и ванилиновую кислоту	0,32	0,30—0,35
Ароматические и подобные протоны } на основании спектров ЯМР	2,5	2,4
Алифатические протоны } на основании спектров ЯМР	3,8	3,8

* Расчет сделан на средний состав структурного звена.

** Группа X = *p*-оксибензиловые спирты и *p*-оксибензиловые алкиловые эфиры. Группа Z = *p*-алкоксibenзиловые спирты; группа В = *p*-алкоксибензиловые алкиловые эфиры.

Подробная характеристика и оценка сконструированного фрагмента молекулы лигнина, а также его сравнение с природным и биосинтетическим лигнинами дается в ряде последних работ Фрейденберга^{209, 215, 225, 244—247}. В настоящем обзоре мы ограничимся лишь таблицей, в которой сравниваются некоторые характеристики лигнина ели с теми же данными, рассчитанными на основании схемы фрагмента лигнина (табл. 2).

Как видно из данных табл. 2, характеристики, предсказанные на основании сконструированной Фрейденбергом схемы и охватывающие широкий диапазон химических реакций лигнина, хорошо соответствуют экспериментально найденным величинам. Это дало основание Фрейденбергу²²⁵ утверждать, что в настоящее время в химии лигнина нет таких фактов, которые не могли бы быть объяснены приведенной схемой.

Заканчивая рассмотрение работ Фрейденберга по биосинтезу лигнина *in vitro*, следует остановиться на некоторых методологических вопросах.

Фрейденберг²⁰⁹ справедливо полагает, что сравнение биосинтетического и природного лигнинов правомерно лишь тогда, когда в обоих случаях одинаковы: 1) исходные мономерные продукты и их соотношение; 2) условия образования лигнина (энзиматические системы, температура и т. д.); 3) конечные продукты.

Как показано в предыдущих разделах, на настоящем этапе исследований все эти условия представляются одинаковыми как при биосинтезе лигнина *in vitro*, так и при образовании лигнина в растении. На основании идентичности исходных материалов и конечных продуктов при синтезе лигнина *in vitro* и *in vivo* Фрейденберг²⁰⁹ приходит к заключению

о тождественности механизмов природной и искусственной лигнификации и аналогичности образующихся в обоих случаях промежуточных соединений. Более того, Фрейденберг²⁰² полагает, что данные, полученные в ходе исследования биосинтеза ДГП из *p*-оксикоричных спиртов, могут быть использованы для объяснения структуры природного лигнина.

Известно, что строение полисахаридов, протеинов и других биополимеров устанавливается на основании идентификации олигомерных продуктов, полученных из них в результате реакций расщепления (главным образом гидролиза). Установление строения лигнина на основании структур олиголигнолов, образующихся во время его биосинтеза *in vitro*, является, по сути дела, первой попыткой установления подобным образом структуры сложного полимерного вещества. Нельзя забывать и о том, что роль лигнина в растении обусловливает ряд особенностей его природного синтеза. В отличие от синтеза протеинов, молекулы которых строятся с помощью матриц, что обеспечивает совершенно точное их воспроизведение, многие стадии биосинтеза лигнина протекают по закону случая, что обусловливает многообразие типов внутримолекулярных связей в его макромолекуле. Все это необходимо учитывать при оценке сконструированной Фрейденбергом схемы фрагмента молекулы лигнина.

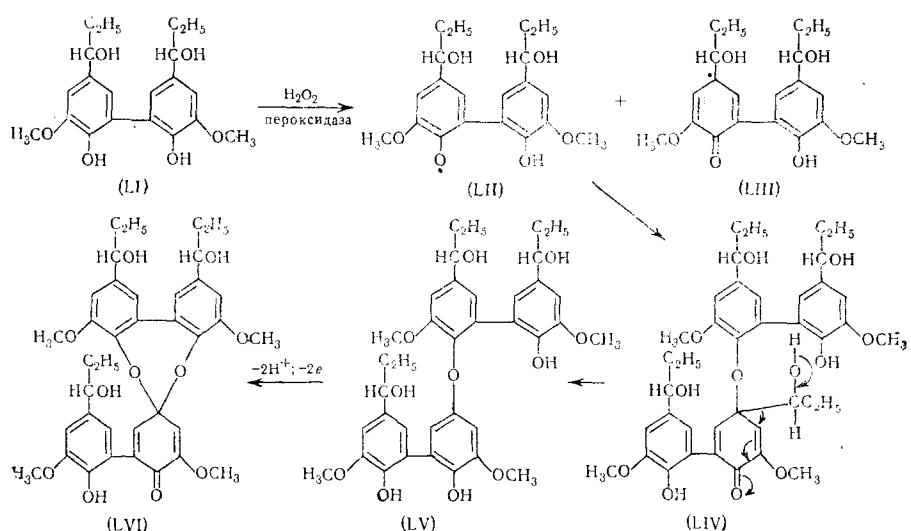
Исходя из высшесказанного, следует подчеркнуть, что цикл работ Фрейденберга по получению и исследованию биосинтетического лигнина внес значительный вклад в химию лигнина. Сконструированная Фрейденбергом схема фрагмента макромолекулы лигнина, несомненно, дает ориентированное представление о строении лигнинов. Основные выводы Фрейденберга подтверждены результатами последних работ Нимца^{248–250} по выделению димерных и олигомерных фрагментов лигнина методом мягкого гидролиза (перколяции) древесины. Однако рассматриваемые в следующем разделе работы Пью по энзиматическому дегидрированию *p*-оксифенилалкилкарбинонов и *p*-оксипропиофенонов свидетельствуют о наличии ряда новых аспектов биосинтеза лигнина, не учтенных теорией Фрейденберга. Вполне вероятна возможность и иных комбинаций радикалов, приводящих к образованию еще не выявленных структурных элементов лигнина. Таким образом, вопрос образования лигнина в растениях и *in vitro* требует дальнейшего изучения.

6. Энзиматическое дегидрирование других фенилпропановых соединений и «химический синтез» лигнина

Опубликовано значительное количество исследований по получению лигниноподобных полимеров путем энзиматического дегидрирования иных, чем конифериловый спирт, фенольных предшественников. Эти работы, с достаточной полнотой рассмотренные в монографии Браунса², представляют сравнительно меньший интерес, поскольку посвящены в основном исследованию конечных продуктов дегидрополимеризации. В этом отношении от них выгодно отличаются недавно опубликованные работы Пью^{251–255} по энзиматическому дегидрированию ряда фенольных соединений, структурно родственных лигнину.

В результате исследования дегидрирования модельных фенолов, преимущественно без С—С конъюгированных с ароматическим кольцом связей в боковой цепи (эвгенол, аллилсирингол, изоэвгенол, дегидродиэвгенол и др.), действием пероксидазы и H_2O_2 Пью и сотр.²⁵¹ пришли к заключению, что при образовании лигнина значительную роль, помимо бифенильных связей, играют дифенилэфирные связи между мономерными

звеньями. Кроме того, авторы показали, что в процессе энзиматического дегидрирования исследованных фенолов образуются хинонметиды иного типа, нежели уже описанные в литературе, которые, по мнению авторов, также могут принимать участие в процессе образования лигнина. Позднее Пью и Коннорс²⁵² опубликовали результаты исследования энзиматического дегидрирования ряда *p*-оксифенилалкилкарбинолов. При дегидрировании гвяцилэтилкарбинола в водном растворе пероксидазой и перекисью водорода образуется неизвестный ранее дibenzo [*d, f*] [1, 3] диоксепин (LVI) с отщеплением боковой цепи в виде пропионового альдегида.



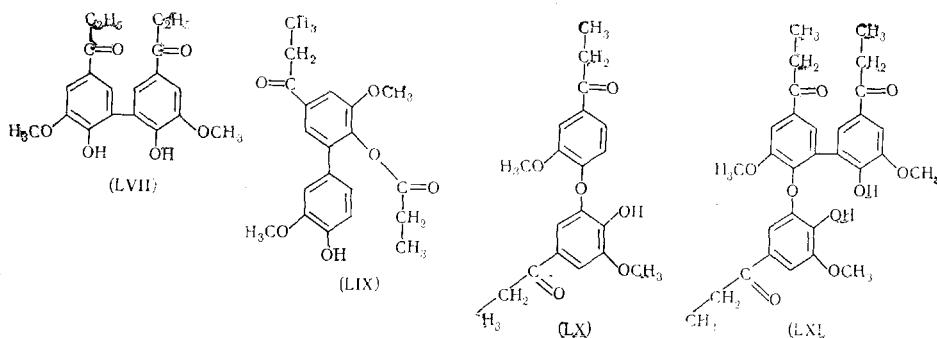
Предложенный авторами²⁵² механизм образования диоксепина (LVI) заключается в первоначальном образовании дегидро-*бис*-гвяцилэтилкарбинола (LI) с его последующим дегидрированием, которое приводит к получению феноксильного радикала бифенила (LII), сочетающегося с циклогексадиеноновой мезомерной формой того же радикала (LIII), давая диеноновый тетрамер (LIV). Последний далее повторно ароматизируется в результате отщепления пропионового альдегида до (LV), который при дальнейшем дегидрировании дает феноксильный и *p*-циклогексадиеноновый радикалы. Эти радикалы посредством интрамолекулярного сочетания комбинируются в диоксепин (LVI).

Авторы показали²⁵², что аналогичный тип реакции с образованием соответствующего диоксепина претерпевает и гвяцилглицерин- β -гвяциловый эфир, аналог очень важного димерного промежуточного продукта биосинтеза лигнина *in vitro*. Кроме того, получены указания, что и другие *p*-оксибензиловые спирты и некоторые эфиры реагируют аналогичным образом.

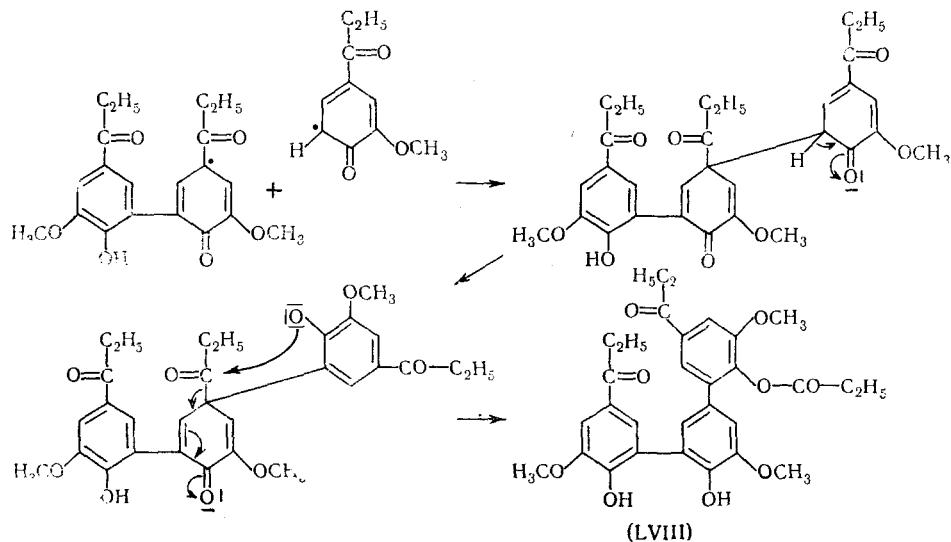
Результаты проведенного исследования позволили Пью и Коннорсу прийти к заключению о важной роли, которую играют при биосинтезе лигнина циклогексадиеноевые формы феноксильных радикалов. Это особенно справедливо в тех случаях, когда блокировано орто-положение по отношению к фенольной группе, как в случае наличия бифенильной связи, дифенилэфирной связи или метоксильной группы у силеневых структур. Сочетание с участием этого типа радикала обычно сопровождается отщеплением боковой цепи, а в случае наличия бифенильных

групп приводит к образованию структур диоксепинового типа. Последние могут входить в состав макромолекулы лигнина как таковые или в виде хиноидных структур, образующихся в результате гидролиза диоксепиновых структур.

Пью и Коннорс²⁵³ осуществили также энзиматическое дегидрирование ряда *p*-оксипропиофенонов. При дегидрировании пропиогвайакона в водном растворе действием пероксидазы и перекиси основным продуктом является, *o*, *o*'-диоксибифенильное соединение — дегидропропиогвайакон (LVII). Помимо этого соединения идентифицированы трифенильное производное (LVIII), обладающее до сих пор неизвестным для лигнина, *o*, *p*'-бифенильным типом связи, а также пропионатной сложноЭфирной группой; димерный сложный эфир (LIX), *o*-дифениловый эфир (LX) и тример (LXI), содержащий как *o*, *o*'-бифенильную, так и *o*-дифенильную эфирную связь.



По мнению Пью и Коннорса²⁵⁴, механизм образования тримера (LVIII) заключается в сочетании циклогексадиеноновой мезомерной формы радикала бифенила с мезомерным орто-радикалом. За этим сочетанием следует повторная ароматизация диенонового кольца интрамолекулярной нуклеофильной атакой на его карбонильную группу в боковой

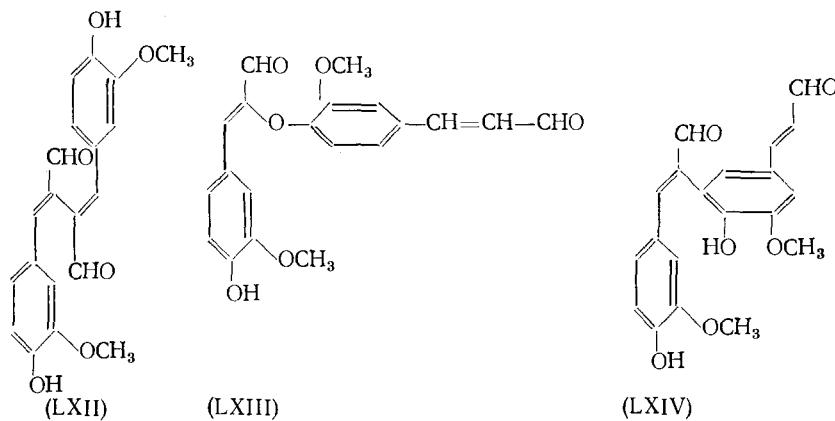


цепи феноксильным ионом, образованным депротонизацией верхнего звена, вследствие чего имеет место перенос боковой цепи, что и приводит к образованию сложного эфира (LVIII).

Образование сложных эфиров путем переноса боковой цепи авторы²⁵⁴ показали при помощи спектральных методов также на продуктах дегидрирования ванилина, ацетогвайякона и этилванилата, и на основании этого пришли к выводу, что указанная реакция, по-видимому, имеет общий характер.

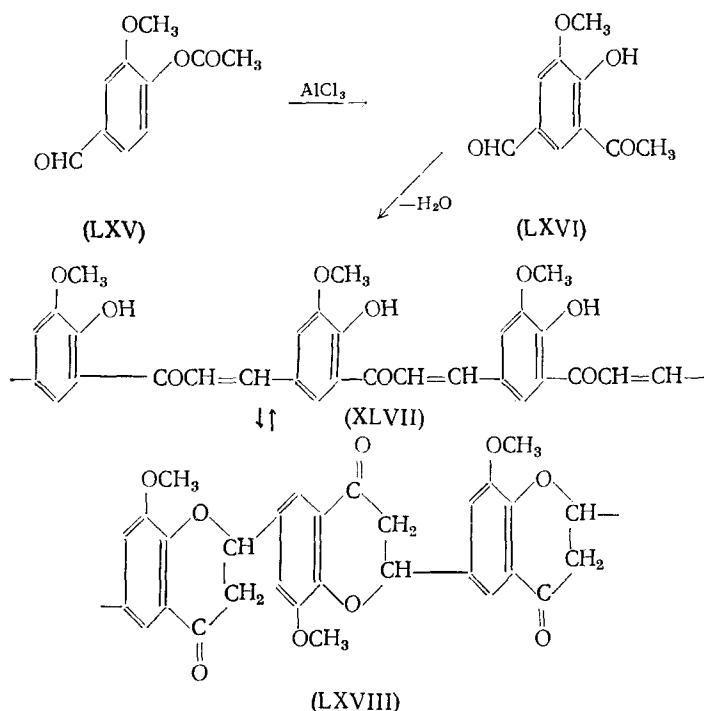
Полученные результаты позволили высказать предположение о наличии в лигнине *o*, *p*'-ориентированных бифенильных связей — неизвестного ранее типа связи между мономерными звеньями, а также о том, что сложные эфиры алифатических кислот являются структурами, присущими макромолекуле лигнина.

Коннорс, Чен и Пью²⁵⁵ осуществили дегидрирование *транс*-кониферилового альдегида в водном растворе действием пероксидазы и H_2O_2 . Показано, что основную часть продуктов реакции составляют три неизвестных ранее димера: 2,3-диформил-1,4-ди-5-гвайацилбута-1,3-диен (LXII); α -(4- β -формилванил-2-метоксифенокси)конифериловый альдегид (LXIII) и α -(5- β -формилванил-2-окси-3-метоксифенил)конифериловый альдегид (LXIV):



Результаты рассмотренных выше исследований по энзиматическому дегидрированию различных модельных соединений лигнина, осуществленных Пью и сотр., свидетельствуют о наличии некоторых новых аспектов в процессе биосинтеза лигнина *in vitro* и могут рассматриваться как дополнение к теории Фрейденберга. Несомненно, последующие исследования расширят современные представления о процессе биосинтеза лигнина и приведут к обнаружению новых структурных особенностей этого полимера.

И наконец, в заключение следует упомянуть о работах Рассела^{256–259} по химическому синтезу лигнина, которые представляют, пожалуй, единственную попытку такого рода. В качестве исходного соединения автор использовал моноацетат ванилина (LXV), который в результате перегруппировки Фриса давал 2-окси-3-метокси-5-формилакетофенон (LXVI). Последний легко претерпевал конденсационную полимеризацию, давая LXVII, который, в свою очередь, циклизовался до поли-8-метоксидигидробензопирона (LXVIII). Полученный полимер, согласно данным Рассела, во многих отношениях аналогичен лигнину ели:



Следует отметить, что если при биохимическом синтезе лигнина возникающие ароксильные радикалы, реагируя в различных формах, образуют различные продукты рекомбинации, что не дает возможности получать строго определенный порядок взаимосвязи мономеров в полимере, то в случае химического синтеза указанная неупорядоченность не имеет места. Современные представления о неоднородности строения лигнина не отвечают «формуле» Рассела, поэтому его работы не получили дальнейшего развития и приведены здесь лишь с точки зрения исторического интереса.

IV. НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ БИОСИНТЕЗА ЛИГНИНА *IN VIVO*

На основании результатов исследования процесса биосинтеза лигнина *in vitro*, Фрёйденберг^{147, 260, 261} выдвинул гипотезу образования лигнина в растении. В период вегетации в камбимальном слое древесины происходит активный процесс формирования новых клеток. Молодые, еще не одревесневшие клетки, расположенные рядом с камбием, по мере удаления их от камбимального слоя постепенно сменяются толстостенными зрелыми клетками, которые дают интенсивное красное окрашивание при обработке флороглюцином + HCl. В камбимальном слое и по обе стороны от него в значительных количествах обнаруживается кониферин. Однако присутствующие в прикамбимальном слое лакказа и пероксидаза способны дегидрировать лишь конифериловый спирт. На основании этого следует ожидать наличия в этой части древесной ткани β -глюкозидазы, которая и была обнаружена на срезах 2-летних еловых побегов, обработанных индиканом (глюкозид индоксила). β -Глюкозидаза расщепляла индикан, и образующийся свободный индоксил быстро превращался на воздухе в индиго, указывая местоположение β -глюкозидазы. Оказалось, что β -глюкозидаза отсутствует как в молодых клетках прикам-

бимального слоя, так и в зрелых одревесневших клетках и обнаруживается в большом количестве в промежуточном слое, который и является, очевидно, зоной, где образуется лигнин. Исходя из вышесказанного Фрейденберг полагает, что процесс образования лигнина в растении можно представить следующим образом. Кониферин диффундирует в ткань, где он расщепляется β -глюкозидазой до свободного кониферилового спирта, который под действием пероксидазы и лакказы превращается в лигнин. Как только ткань, особенно внутриклеточные ее части, заполняются сформировавшимся лигнином, клетки отмирают и в них больше не наблюдается присутствия β -глюкозидазы. Интересно отметить, что если действие ферментов продолжается и после того, как ткань заполняется лигнином, это приводит к деградации лигнина. Так, при воздействии лакказы или пероксидазы на суспензию природного или биосинтетического лигнина в воде, эти препараты претерпевают деструкцию, напоминающую гумификацию и деструкцию фенолов в почве. Аналогичная деструкция наблюдается и в том случае, если источником дегидрогеназ является древесная гниль. Кроме того, как уже отмечалось выше, выход ДГП составляет $\sim 90\%$, никогда не достигая 100%. Согласно представлениям Фрейденберга²⁶², это связано с тем, что лигнин частично разлагается при дегидрировании. Таким образом, в процессе образования и деструкции лигнина принимают участие одни и те же ферменты — лакказа и пероксидаза.

Как сказано во введении, процесс лигнификации нельзя рассматривать изолированно от других процессов, протекающих при формировании растительной клетки. Комплекс этих процессов включает как биосинтез различных компонентов растительной ткани, в процессе которого между ними могут возникать различного типа химические связи, так и образование различных морфологических подразделений клеточной стенки. Указанные проблемы, несомненно, представляют значительный интерес как в теоретическом, так и в практическом отношении. В то же время имеющийся в литературе материал весьма ограничен, что не позволяет в настоящее время рассматривать вопросы биосинтеза единого комплекса компонентов клеточной стенки растения. Очевидно, такая попытка — дело будущего, когда будут в достаточной степени уяснены не только проблемы биосинтеза отдельных растительных компонентов (лигнина, целлюлозы и гемицеллюлоз), но и общие закономерности формирования растительной клетки. Однако и в настоящее время ряд интересных данных, полученных при исследовании процесса лигнификации в культурах ткани, позволяет уяснить некоторые аспекты биосинтеза лигнина *in vivo*.

Как указывалось выше, метод культуры ткани широко использовался^{31, 99, 101, 158–165, 263–271} при исследовании различных энзиматических систем, участвующих в биосинтезе мономерных предшественников лигнина, а также при испытании различных меченых соединений в качестве предшественников лигнина. Указанные исследования рассмотрены в соответствующих разделах главы II. Помимо этих более или менее локальных задач, эксперименты с культурами ткани позволили подойти к решению более широких проблем биохимии и физиологии растений. Эти проблемы можно сформулировать следующим образом: 1) установление возможности локального протекания процесса лигнификации либо необходимости для этого процесса каких-либо соединений, поступающих из корней или листьев растения; 2) установление тождественности предшественников лигнина при условии сохранения или исключения коррелятивных отношений в растительном организме (в том случае, если существует указанная локальность биосинтеза ароматических предшест-

венников лигнина); 3) установление химической природы возможных предшественников лигнина и на основании этого выяснение, идет ли процесс лигнификации в изолированных тканях теми же путями, что и у целых растений; 4) выяснение физиологической роли промежуточных метаболитов процесса лигнификации в обмене веществ целого организма.

В ходе исследований с использованием метода культуры ткани установлено²⁶⁴, что лигнин, откладываемый в клеточных стенках элементов ксилемы изолированных тканей, близок по химическому составу к лигнину высших растений. Кроме того, показано¹⁶⁵, что биосинтез лигнина в изолированных тканях, длительно живущих в культуре *in vitro*, происходит локально, за счет углеводов питательной среды. Следовательно, для лигнификации не требуется притока специфических соединений из корней или надземных органов растения. Поскольку обнаружено, что торможение роста тканей не влияет на процесс накопления лигнина, высказано предположение¹⁶², что процессы лигнификации и роста в известной степени разобщены.

Выводы, полученные в результате исследований с культурами ткани, представляют значительный интерес и позволяют подойти к вопросам биосинтеза лигнина с более широких позиций, чем это позволяют эксперименты по биосинтезу лигнина *in vitro*. В то же время несомненно, что полученные выводы нуждаются в определенных дополнениях и корректировке.

И наконец, в заключение следует сказать несколько слов о биосинтезе лигнина в связи с вопросами онтогенеза и филогенеза растений.

В 1934 г. Холмберг²⁷² провел исследование лигнинов, выделенных из 50 видов растений с помощью тиогликолевой кислоты, и обнаружил, что содержание углерода в лигнинах голосемянных на 3—4% выше, чем в лигнинах покрытосемянных, а содержание метоксильных групп в последних больше, чем в первых. Позднее Гибберт и сотр.^{273—275} использовали предложенный Фрейденбергом²⁷⁶ метод нитробензолного окисления для исследования растений различных классов и показали, что в то время как основным продуктом нитробензолного окисления лигнина голосемянных является ванилин, двудольные покрытосемянные дают смесь ванилина и сиреневого альдегида, а однодольные покрытосемянные — смесь ванилина, сиреневого альдегида и *p*-оксибензальдегида. На основании полученных результатов высказано предположение, что реакция со щелочным нитробензолом может быть использована для таксономической классификации растительных материалов. Последующие исследования^{277, 278}, в которых использованы более совершенные методы разделения продуктов окисления, подтвердили основные выводы Гибберта, внеся в них некоторые уточнения. Полученные результаты легли в основу общепринятой в настоящее время концепции о том, что лигнин строится из производных фенилпропана с различной степенью метоксилирования в ароматическом ядре. Обширные исследования Манской^{279—282}, Кратцля²⁸³ и др., посвященные изучению лигнинов различных растительных групп, позволили высказать интересные соображения о роли лигнина в процессе филогенеза растений. Так, Манская^{279—282} исследовала ныне живущие формы растений, близкие к ископаемым, с целью установления образования лигнина в процессе филогенеза в различных растительных группах. Отличительные черты лигнина в различных растительных группах, характер изменений его химического состава от низших растений к более высокоорганизованным, по мнению автора, позволяет представить относительное содержание лигнина и соотношение в нем элементов различной степени метоксилирования в растениях в пределах прошедших геологических эпох. Лигнин, впервые наблюдаемый, по дан-

ным большинства исследователей, у сосудистых растений в ряду папоротниковых (*Pteridophyta*) (в последние годы получены определенные указания о его наличии уже во мхах²⁸⁴ и даже водорослях^{285, 286}), в процессе эволюции растений, по-видимому, претерпел значительные как количественные, так и качественные изменения.

Имеется ряд данных по изменению лигнина в процессе онтогенеза растений. Так, Стоун и сотр.²⁸⁷ показали, что отношение ванилина к силеневому альдегиду в продуктах окисления лигнина пшеницы изменяется в зависимости от возраста растений. Хигучи¹³⁴ провел исследование состава лигнина в верхней, средней и нижней частях побегов трех видов бамбука. Автор¹³⁴ показал, что по мере увеличения лигнификации значительно возрастает суммарное содержание альдегидов (в пересчете на лигнин Класона), получаемых при нитробензольном окислении, а также отношение силеневого альдегида к ванилину. В верхней части побегов бамбука, где степень лигнификации была наиболее низкой, доля силеневого альдегида в продуктах нитробензольного окисления также была наиболее низкой. По мере лигнификации доля силеневого альдегида возрастала, достигая максимума в зрелом растении. Фрейденберг и Торрес-Серрес²⁸⁸ показали, что камбальный слой 1- или 2-летних еловых побегов содержит сравнительно больше *p*-глюокумарового спирта по сравнению с более зрелыми еловыми растениями. Соответственно содержание метоксильных групп в ЛМР из молодых еловых растений составляет 12—13% по сравнению с 15,6% в ЛМР из зрелой ели^{242, 288}. Эти результаты дают возможность предположить, что изменения лигнина в процессе онтогенеза соответствуют его изменениям в процессе филогенеза.

Рассмотренные выше данные, несомненно, представляют значительный интерес, хотя на настоящем этапе исследований еще не представляется возможным дать объяснения изменению степени метоксилирования лигнина в процессе онтогенеза и филогенеза растений.

ЛИТЕРАТУРА

1. F. E. Brauns, *The chemistry of lignin*. Academic Press Inc., N. Y., 1952, гл. XXVI—XXVII.
2. Ф. Э. Браунс, Д. А. Браунс, *Химия лигнина*, «Лесная пром-сть», М., 1964, гл. 25.
3. I. A. Pearle, *The chemistry of lignin*. Marcel Dekker, Inc., N. Y., 1967, гл. 4.
4. K. Freudenberg, A. C. Neish, *Constitution and biosynthesis of lignin*, Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—N. Y., 1968.
5. F. F. Nord, *Tappi*, **47**, 624 (1964).
6. В. Д. Шуберт, *Биохимия лигнина*, «Лесная пром-сть», М., 1968.
7. W. J. Schubert, *Compr. Biochem.*, **20**, 193 (1968).
8. K. Kratzl, в кн.: *Cellular Ultrastructure of Woody Plants*. Syracuse University Press, 1965, стр. 157—180.
9. K. Kratzl, *Cell. Chem. Techn.*, **1**, 379 (1967).
10. J. M. Harkin, *Fortschr. Chem. Forsch.*, **6**, 101 (1966).
11. С. М. Манская, *Химия древесины*, **1**, 31 (1968).
12. С. А. Браун, в кн.: *Биохимия фенольных соединений*, «Мир», М., 1968, гл. 9, стр. 285—313.
13. S. A. Brown, *BioScience* **19**, 115 (1969).
14. М. С. Бардинская, *Растительные клеточные стенки и их образование*. «Наука», М., 1964.
15. S. M. Siegel, в кн. *Biology of the Mouth*. Publ. Amer. Ass. Advan. Sci., No. 89, 111, Washington, D. C., 1968.
16. S. M. Siegel, *Compr. Biochem.*, **26A**, 1 (1968).
17. D. H. Northcote, *Essays Biochem.*, **5**, 89 (1969).
18. М. Н. Зарометов, *Биохимия катехинов*, «Наука», М., 1964.
19. Т. А. Джессман, в кн. *Биогенез природных соединений*, «Мир», М., 1965, гл. 12, стр. 482—529.
20. А. С. Нейш, в кн. см.¹², гл. 8, стр. 234—284.

21. C. E. Haritt, G. O. Burr, Proc. Intern. Botan. Congr., 7th, Stockholm 1950, стр. 748 (Pub. 1953).
22. J. E. Stone, Canad. J. Chem., **31**, 207 (1953).
23. S. A. Brown, K. G. Tanner, J. E. Stone, Там же, **31**, 755 (1953).
24. З. Н. Крейцберг, В. Н. Сергеева, С. В. Милютина, Тр. Ин-та лесохоз. проблем, **12**, 235 (1957).
25. З. Н. Крейцберг, Я. К. Грабовский, Изв. АН Латв. ССР., сер. хим., 1963, № 3, 391.
26. W. J. Schubert, S. N. Acerbo, Arch. biochem. biophys., **83**, 178 (1959).
27. S. N. Acerbo, W. J. Schubert, F. F. Nord, J. Am. Chem. Soc., **82**, 735 (1960).
28. K. Kratzl, H. Faigle, Monatsh. Chem., **90**, 768 (1959).
29. K. Kratzl, H. Faigle, Naturforsch., **15B**, 4 (1960).
30. M. Hasegawa, T. Higuchi, J. Japan. Forest. Soc., **42**, 305 (1960).
31. M. Hasegawa, T. Higuchi, H. Ishikawa, Plant Cell Physiol., **1**, 173 (1960).
32. В. Н. Сергеева, З. Н. Крейцберг, см. ²⁴, стр. 245.
33. P. Klassen, Ber., **63B**, 1548 (1930).
34. P. Klassen, Там же, **69B**, 676 (1936).
35. K. Kratzl, J. Zauner, Holzforsch. Holzverwert., **14**, 108 (1962).
36. B. D. Davis, Adv. Enzymol., **16**, 247 (1955).
37. P. R. Srinivasan, H. T. Shigeura, M. Sprecher, D. B. Sprinson, B. D. Davis, J. Biol. Chem., **220**, 477 (1956).
38. B. D. Davis, Arch. biochem. biophys., **78**, 497 (1958).
39. D. B. Sprinson, Adv. Carbohydr. Chem., **15**, 235 (1960).
40. F. Gibson, L. M. Jackman, Nature, **198**, 388 (1963).
41. F. Gibson, Biochem. J., **90**, 256 (1964).
42. M. I. Gibson, F. Gibson, Там же, **90**, 248 (1964).
43. S. A. Brown, A. C. Neish, Nature, **175**, 688 (1955).
44. G. Eberhardt, W. J. Schubert, J. Am. Chem. Soc., **78**, 2835 (1956).
45. D. R. McCalla, A. C. Neish, Canad. J. Biochem. Physiol., **37**, 531 (1959).
46. D. R. McCalla, A. C. Neish, Там же, **37**, 537 (1959).
47. O. L. Gamborg, A. C. Neish, Там же, **37**, 1277 (1959).
48. M. Hasegawa, S. Yoshida, T. Nakagawa, Kagaku (Science), **24**, 421 (1954).
49. M. Hasegawa, T. Nakagawa, S. Yoshida, J. Japan. Forest. Soc., **39**, 159 (1957).
50. T. Higuchi, Proc. Intern. Congr. Biochem., 4th, Vienna, 1958, **2**, 161 (Pub. 1959).
51. V. Plouvier, C. r., **249**, 1563 (1959).
52. V. Plouvier, Там же, **250**, 1721 (1960).
53. V. Plouvier, Там же, **252**, 599 (1961).
54. V. Plouvier, Bull. Soc. France, Physiol. Vegetale, **7**, 44 (1961).
55. M. Nandy, N. C. Ganguli, Biochim. biophys. acta, **48**, 608 (1961).
56. M. Nandy, N. C. Ganguli, J. Sci. Ind. Res. (India), **21C**, No. 2, 34 (1962).
57. S. Mitsuhashi, B. D. Davis, Biochim. biophys. acta, **15**, 54 (1954).
58. Номенклатура ферментов. М., 1966.
59. D. Balinsky, D. D. Davies, Biochem. J., **80**, 300 (1961).
60. D. Balinsky, D. D. Davies, Там же, **80**, 292 (1961).
61. D. Balinsky, D. D. Davies, Там же, **80**, 296 (1961).
62. M. Nandy, N. C. Ganguli, Arch. biochem. biophys., **92**, 399 (1961).
63. T. Higuchi, M. Shimada, Plant Cell Physiol., **8**, 61 (1967).
64. D. Balinsky, D. D. Davies, J. Exptl. Bot., **13**, 414 (1962).
65. O. L. Gamborg, Canad. J. Biochem., **44**, 791 (1966).
66. K. Paech, Biochemie und Physiologie der sekundären Pflanzenstoffe, Springer-Verlag, Berlin — Гёттинген — Гейдельберг, 1950, стр. 153—154.
67. С. М. Манская, Л. А. Кодина, ДАН, **123**, 733 (1958).
68. С. М. Манская, Л. А. Кодина, Ж. прикл. химии, **32**, 2711 (1959).
69. L. H. Weinstein, C. A. Porter, H. J. Laurencot, мл., Contr. Boyce Thompson Inst., **20**, 121 (1959).
70. L. H. Weinstein, C. A. Porter, H. J. Laurencot, мл., Nature, **183**, 326 (1959).
71. L. H. Weinstein, C. A. Porter, H. J. Laurencot, мл., Contr. Boyce Thompson Inst., **21**, 201 (1961).
72. L. H. Weinstein, C. A. Porter, H. J. Laurencot, мл., Nature, **194**, 205 (1962).
73. O. Goldschmid, G. R. Quimby, Tappi, **47**, 528 (1964).
74. Я. К. Грабовский, З. Н. Крейцберг, В. Н. Сергеева, Изв. АН Латв. ССР, сер. хим., 1967, № 1, 114.
75. O. L. Gamborg, Phytochem., **6**, 1067 (1967).
76. O. L. Gamborg, Biochim. biophys. acta, **128**, 483 (1966).
77. Е. Е. Конин, см. ¹², гл. 10, стр. 314—339.
78. O. L. Gamborg, F. J. Simpson, Canad. J. Biochem., **42**, 583 (1964).

79. O. L. Gamborg, F. W. Keeley, *Biochim. biophys. acta*, **115**, 65 (1966).
80. D. G. Wilson, K. W. King, R. H. Burris, *J. Biol. Chem.*, **208**, 863 (1954).
81. В. Л. Кретович, Ж. В. Успенская, *Биохимия*, **23**, 248 (1958).
82. O. L. Gamborg, L. R. Wetter, *Canad. J. Biochem. Physiol.*, **41**, 1733 (1963).
83. O. L. Gamborg, *Canad. J. Biochem.*, **43**, 723 (1965).
84. T. Higuchi, M. Shimada, *Plant Cell Physiol.*, **8**, 71 (1967).
85. G. Schneider, *Physiol. Plant.*, **14**, 638 (1961).
86. J. F. Thompson, C. J. Morris, S. Asen, F. Irreverre, *J. Biol. Chem.*, **236**, 1183 (1961).
87. C. J. Morris, J. F. Thompson, S. Asen, F. Irreverre, *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 6069 (1959).
88. P. O. Larsen, A. Kjaer, *Acta chem. scand.*, **16**, 142 (1962).
89. В. Л. Кретович, *Основы биохимии растений*, «Высшая школа», М., 1971, стр. 156—158.
90. A. C. Neish, см.⁴, стр. 17—30.
91. S. A. Brown, A. C. Neish, F. M. Claire, M. D. Chisholm, *Canad. J. Biochem. Physiol.*, **33**, 948 (1955).
92. S. A. Brown, A. C. Neish, *Там же*, **34**, 769 (1956).
93. A. C. Neish, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **11**, 55 (1960).
94. S. A. Brown, *Canad. J. Bot.*, **39**, 253 (1961).
95. J. Koukol, E. E. Conn, *J. Biol. Chem.*, **236**, 2692 (1961).
96. A. C. Neish, *Phytochem.*, **1**, 1 (1961).
97. M. R. Young, A. C. Neish, *Там же*, **5**, 1121 (1966).
98. M. R. Young, G. H. N. Towers, A. C. Neish, *Canad. J. Bot.*, **44**, 341 (1966).
99. T. Higuchi, *Canad. J. Biochem. Physiol.*, **40**, 31 (1962).
100. T. Higuchi, S. A. Brown, *Там же*, **41**, 65 (1963).
101. T. Higuchi, S. A. Brown, *Там же*, **41**, 613 (1963).
102. H. Reznik, R. Urban, *Naturwiss.*, **44**, 13 (1957).
103. H. Reznik, R. Urban, *Там же*, **44**, 592 (1957).
104. S. Z. El-Basyouni, A. C. Neish, G. H. N. Towers, *Phytochem.*, **3**, 627 (1964).
105. S. Z. El-Basyouni, A. C. Neish, *Там же*, **5**, 683 (1966).
106. J. B. Harborne, J. J. Corner, *Biochem. J.*, **81**, 242 (1961).
107. J. B. Harborne, J. J. Corner, *Arch. biochem. biophys.*, **92**, 192 (1961).
108. C. W. Glennie, B. A. Bohm, *Canad. J. Biochem.*, **44**, 281 (1966).
109. D. E. Bland, A. F. Logan, *Phytochem.*, **6**, 1075 (1967).
110. C. C. Levy, M. Zucker, *J. Biol. Chem.*, **235**, 2418 (1960).
111. P. M. Nair, L. C. Vining, *Phytochem.*, **4**, 401 (1965).
112. P. M. Nair, L. C. Vining, *Там же*, **4**, 161 (1965).
113. D. W. Russell, E. E. Conn, *Arch. biochem. biophys.*, **122**, 256 (1967).
114. M. Shimada, T. Yamazaki, T. Higuchi, *Phytochem.*, **9**, 1, (1970).
115. R. U. Byerrum, J. H. Flokstra, L. J. Dewey, C. D. Ball, *J. Biol. Chem.*, **210**, 633 (1954).
116. R. L. Hamill, R. U. Byerrum, C. D. Ball, *Там же*, **224**, 713 (1957).
117. З. Н. Крейцберг, Я. К. Грабовский, *Изв. АН Латв. ССР, сер. хим.*, **1963**, № 1, 118.
118. B. J. Finkle, R. F. Nelson, *Biochim. biophys. acta*, **78**, 747 (1963).
119. B. J. Finkle, M. S. Masri, *Там же*, **85**, 167 (1964).
120. D. Hess, *Naturforsch.*, **19b**, 447 (1964).
121. D. Hess, *Ztschr. Pflanzenphysiol.*, **53**, 460 (1965).
122. D. Hess, *Там же*, **55**, 374 (1966).
123. T. Higuchi, M. Shimada, H. Ohashi, *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 1459 (1967).
124. M. Shimada, H. Ohashi, T. Higuchi, *Phytochem.*, **9**, 2463 (1970).
125. K. Kratzl, G. Puschmann, *Holzforschung*, **14**, 1 (1960).
126. P. F. T. Vaughan, V. S. Butt, *Biochem. J.*, **104**, 65P (1967).
127. P. F. T. Vaughan, V. S. Butt, *Там же*, **107**, 7P (1968).
128. P. F. T. Vaughan, V. S. Butt, *Там же*, **111**, 32P (1969).
129. T. Higuchi, S. A. Brown, *Canad. J. Biochem. Physiol.*, **41**, 621 (1963).
130. G. G. Gross, K. H. Bolkart, M. H. Zenk, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **32**, 173 (1968).
131. G. G. Gross, M. H. Zenk, *Eur. J. Biochem.*, **8**, 413 (1969).
132. G. G. Gross, M. H. Zenk, *Там же*, **8**, 420 (1969).
133. T. Higuchi, Y. Ito, I. Kawamura, *J. Japan. Forest. Soc.*, **37**, 239 (1955).
134. T. Higuchi, *Physiol. Plant.*, **10**, 633 (1957).
135. C. Neuberg, J. Hirsch, *Biochem. Ztschr.*, **115**, 282 (1921).
136. C. Neuberg, L. Liebermann, *Там же*, **121**, 311 (1921).
137. C. Neuberg, E. Reinfurth, *Там же*, **143**, 553 (1923).
138. Y. Shimazu, *J. Chem. Soc. Japan*, **71**, 503 (1950).
139. P. F. Smith, D. Hendlin, *J. Bacteriol.*, **65**, 440 (1953).
140. P. F. Smith, D. Hendlin, *Appl. Microbiol.*, **2**, 294 (1954).

141. T. Higuchi, I. Kawamura, *J. Japan Wood Res. Soc.*, **2**, 223 (1956).
 142. С. М. Манская, М. С. Бардинская, *Биохимия*, **17**, 711 (1952).
 143. R. A. Black, A. A. Rosen, S. L. Adams, *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 5344 (1953).
 144. A. Stepanow, A. Kusin, *Ber.*, **64B**, 1345 (1931).
 145. S. A. Brown, A. C. Neish, *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 2419 (1959).
 146. H. Ishikawa, K. Takaichi, *J. Japan. Forest. Soc.*, **37**, 244 (1955).
 147. K. Freudenberg, H. Reznik, W. Fuchs, M. Reichert, *Naturwiss.*, **42**, 29 (1955).
 148. K. Freudenberg, *Angew. Chem.*, **68**, 84 (1956).
 149. K. Kratzl, W. Kissler, A. Graf, G. Hofbauer, *Monatsh. Chem.*, **90**, 526 (1959).
 150. K. Kratzl, *Tappi*, **43**, 650 (1960).
 151. M. H. Zenk, *Proc. Meet. Fed. Eur. Biochem. Soc.*, 2nd, 1965 (Pub. 1966), **3**, 45.
 152. H. Hibbert, *Paper Trade J.*, **113**, No. 4, 35 (1941).
 153. H. Hibbert, *Ann. Rev. Biochem.*, **11**, 183 (1942).
 154. T. Hartig, *Jahrbuch für Förster*, **1**, 263 (1861).
 155. R. E. Kremers, *Tappi*, **40**, 262 (1957).
 156. K. Freudenberg, F. Bittner, *Chem. Ber.*, **86**, 155 (1953).
 157. K. Freudenberg, P. Niedercorn, Там же, **91**, 591 (1958).
 158. A. v. Wacek, O. Härtel, S. Meralla, *Holzforschung*, **7**, 58 (1953).
 159. A. v. Wacek, O. Härtel, S. Meralla, Там же, **8**, 65 (1954).
 160. A. v. Wacek, *Année biol.*, **59**, 53 (1955).
 161. O. Härtel, A. v. Wacek, S. Meralla, *Holzforschung*, **12**, 33 (1958).
 162. R. J. Gautheret, A. v. Wacek, S. Meralla, Там же, **12**, 97 (1958).
 163. F. Barnoud, С. г., **243**, 1545 (1956).
 164. М. С. Бардинская, Тр. И-та лесохоз. проблем и химии древесины, **19**, 25 (1960).
 165. М. С. Бардинская, *ДАН*, **136**, 1486 (1961).
 166. K. Kratzl, G. Billek, E. Klein, K. Buchta, *Monatsh. Chem.*, **88**, 721 (1957).
 167. K. Kratzl, G. Hofbauer, Там же, **89**, 96 (1958).
 168. K. Kratzl, H. Faigle, Там же, **89**, 708 (1958).
 169. F. Tiemann, B. Mendelsohn, *Ber.*, **8**, 1136 (1875).
 170. P. Kłason, *Svensk Kem. Tidskr.*, **9**, 135 (1897).
 171. P. Kłason, *Ber.*, **53B**, 706 (1920).
 172. P. Kłason, Там же, **53B**, 1864 (1920).
 173. P. Kłason, Там же, **55B**, 448 (1922).
 174. P. Kłason, Там же, **56B**, 300 (1923).
 175. P. Kłason, Там же, **58B**, 375 (1925).
 176. P. Kłason, Там же, **58B**, 1761 (1925).
 177. P. Kłason, Там же, **62B**, 635 (1929).
 178. P. Kłason, Там же, **62B**, 2523 (1929).
 179. H. Cousin, H. Hérissey, С. г., **146**, 1413 (1908).
 180. H. Cousin, H. Hérissey, Там же, **147**, 247 (1908).
 181. H. Erdtman, *Biochem. Ztschr.*, **258**, 172 (1933).
 182. H. Erdtman, *Lieb. Ann. Chem.*, **503**, 283 (1933).
 183. R. Pummerer, F. Frankfurter, *Ber.*, **47**, 1472 (1914).
 184. R. Pummerer, E. Cherbuliez, Там же, **47**, 2957 (1914).
 185. R. Pummerer, F. Frankfurter, Там же, **52B**, 1416 (1919).
 186. R. Pummerer, A. Rieche, Там же, **59B**, 2161 (1926).
 187. A. Szent-Györgyi, Там же, **72A**, 53 (1939).
 188. С. М. Манская, Усп. совр. биологии, **23**, 203 (1947).
 189. С. М. Манская, Ферментативное окисление фенольных соединений. М.—Л., Изд. АН СССР, 1949, стр. 24—25.
 190. С. М. Манская, *ДАН*, **62**, 369 (1948).
 191. K. Freudenberg, H. Richtzenhain, *Ber.*, **76B**, 997 (1943).
 192. H. Richtzenhain, Там же, **77B**, 409 (1944).
 193. H. Richtzenhain, *Chem. Ber.*, **81**, 260 (1948).
 194. H. Richtzenhain, Там же, **82**, 447 (1949).
 195. K. Freudenberg, *Angew. Chem.*, **61**, 228 (1949).
 196. K. Freudenberg, W. Heimberger, *Chem. Ber.*, **83**, 519 (1950).
 197. K. Freudenberg, J. M. Harkin, *Phytochem.*, **2**, 189 (1963).
 198. K. Freudenberg, C.-L. Chen, G. Cardinale, *Chem. Ber.*, **95**, 2814 (1962).
 199. K. Freudenberg, *Fortschr. Chem. Org. Naturstoffe*, **20**, 41 (1962).
 200. K. Freudenberg, *Pure Appl. Chem.*, **5**, 9 (1962).
 201. K. Freudenberg, H. Schlüter, *Chem. Ber.*, **88**, 617 (1955).
 202. K. Freudenberg, *Science*, **148**, 595 (1965).
 203. K. Freudenberg, H. Hübner, *Chem. Ber.*, **85**, 1181 (1952).
 204. K. Freudenberg, D. Rasenack, Там же, **86**, 755 (1953).
 205. K. Freudenberg, *Angew. Chem.*, **68**, 508 (1956).

206. K. Freudenberg, C.-L. Chen, J. M. Harkin, H. Nimz, H. Renner, *Chem. Commun.*, 1965, 224.
207. K. Freudenberg, J. M. Harkin, M. Reichert, T. Fukuzumi, *Chem. Ber.*, **91**, 581 (1958).
208. K. Freudenberg, G. Grion, Там же, **92**, 1355 (1959).
209. K. Freudenberg, *J. prakt. Chem.*, **10**, 220 (1960).
210. E. Adler, *Proc. Intern. Congr. Biochem.*, 4th, Vienna, 1958, **2**, 137 (Pub. 1959).
211. K. Freudenberg, K.-C. Renner, *Chem. Ber.*, **98**, 1879 (1965).
212. K. Freudenberg, *J. Polymer Sci.*, **48**, 371 (1960).
213. K. Freudenberg, *Adv. Chem. Ser.*, **59**, 1 (1966).
214. K. Freudenberg, *Brennstoff-Chem.*, **44**, 328 (1963).
215. K. Freudenberg, *Chem. Ber.*, **92**, LXXXIX (1959).
216. K. Freudenberg, G. Grion, J. M. Harkin, *Angew. Chem.*, **70**, 743 (1958).
217. K. Freudenberg, J. M. Harkin, *Chem. Ber.*, **93**, 2814 (1960).
218. K. Freudenberg, M. Friedmann, Там же, **93**, 2138 (1960).
219. K. Freudenberg, H. Nimz, Там же, **95**, 2057 (1962).
220. K. Freudenberg, H. Tausend, Там же, **96**, 2081 (1963).
221. H. Nimz, Там же, **96**, 478 (1963).
222. K. Freudenberg, J. M. Harkin, H.-K. Werner, Там же, **97**, 909 (1964).
223. K. Freudenberg, A. Sakakibara, *Lieb. Ann. Chem.*, **623**, 129 (1959).
224. K. Freudenberg, H. Tausend, *Chem. Ber.*, **97**, 3418 (1964).
225. К. Фрейденберг, в кн. *Химия и биохимия лигнина, целлюлозы и гемицеллюлоз. По материалам Междунар. симп. в Гренобле, «Лесная пром-сть»*, М., 1969, стр. 3.
226. K. Freudenberg, *Holzforschung*, **18**, 3 (1964).
227. K. Freudenberg, K. Seib, K. Dall, *Chem. Ber.*, **92**, 807 (1959).
228. K. Freudenberg, H.-K. Werner, Там же, **97**, 579 (1964).
229. A. Björkman, *Nature*, **174**, 1057 (1954).
230. A. Björkman, B. Person, *Svensk papperstidn.*, **60**, 158 (1957).
231. K. Freudenberg, *Fortschr. Chem. Org. Naturstoffe*, **11**, 43 (1954).
232. K. Freudenberg, K. Dall, *Naturwiss.*, **42**, 606 (1955).
233. K. Freudenberg, W. Siebert, W. Heimberger, R. Kraft, *Chem. Ber.*, **83**, 533 (1950).
234. K. Freudenberg, *Bull. soc. chim. France*, **1959**, 1748.
235. K. Freudenberg, *Proc. Intern. Congr. Biochem.*, 4th, Vienna, 1958, **2**, 121 (Pub. 1959).
236. K. Freudenberg, G. Schuhmacher, *Sitzungsber. Heidelberg. Akad. Wiss., Math.-naturwiss. Kl.* 1953/1955, 127 (Pub. 1956).
237. K. Freudenberg, J. M. Harkin, *Holzforschung*, **18**, 166 (1964).
238. K. Freudenberg, R. Kraft, *Chem. Ber.*, **83**, 530 (1950).
239. K. Freudenberg, V. Jovanović, F. Topfmeier, Там же, **94**, 3227 (1961).
240. K. Freudenberg, V. Jovanović, Там же, **96**, 2178 (1963).
241. K. Freudenberg, K. Jones, H. Renner, Там же, **96**, 1844 (1963).
242. K. Freudenberg, B. Lehmann, Там же, **96**, 1850 (1963).
243. K. Freudenberg, G. S. Sidhu, *Holzforschung*, **15**, 33 (1961).
244. K. Freudenberg, *Ind. Eng. Chem.*, **49**, 1384 (1957).
245. K. Freudenberg, *Mitt. Deut. Ges. Holzforsch.*, **50**, 114 (1963).
246. K. Freudenberg, H. Nimz, *Chem. Commun.*, **1966**, 132.
247. K. Freudenberg, см. ⁴, стр. 107—108.
248. H. Nimz, *Chem. Ber.*, **98**, 533 (1965).
249. H. Nimz, Там же, **100**, 2633 (1967).
250. H. Nimz, Там же, **102**, 799 (1969).
251. Д. Пью, В. Коннорс, А. Куниши, см. ²²⁵, стр. 107.
252. J. C. Pew, W. J. Connors, *J. Org. Chem.*, **34**, 580 (1969).
253. J. C. Pew, W. J. Connors, Там же, **34**, 585 (1969).
254. J. C. Pew, W. J. Connors, *Nature*, **215**, 623 (1967).
255. W. J. Connors, C.-L. Chen, J. C. Pew, *J. Org. Chem.*, **35**, 1920 (1970).
256. A. Russell, *Science*, **106**, 372 (1947).
257. A. Russell, *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 1060 (1948).
258. A. Russell, Там же, **70**, 2864 (1948).
259. A. Russell, J. H. Bailey, H. E. Smith, Там же, **71**, 956 (1949).
260. K. Freudenberg, H. Reznik, H. Boesenberg, D. Rasenack, *Chem. Ber.*, **85**, 641 (1952).
261. K. Freudenberg, H. Reznik, W. Fuchs, M. Reichert, *Angew. Chem.*, **66**, 109 (1954).
262. K. Freudenberg, *Nature*, **183**, 1152 (1959).
263. М. С. Бардинская, В. И. Сафонов, *ДАН*, **129**, 205 (1959).
264. И. Я. Барский, М. С. Бардинская, Там же, **129**, 443 (1959).
265. T. Higuchi, I. Kawamura, I. Morimoto, N. Kimura, *J. Japan. Forest. Soc.*, **36**, 253 (1954).

266. T. Higuchi, Physiol. Plant., **10**, 621 (1957).
267. F. Barnoud, T. Higuchi, J.-P. Joseleau, A. Mollard, C. r., **259**, 3589 (1964).
268. F. Barnoud, T. Higuchi, J.-P. Joseleau, Там же, **259**, 4110 (1964).
269. F. Barnoud, T. Higuchi, J.-P. Joseleau, A. Mollard, Там же, **259**, 4339 (1964).
270. T. Higuchi, F. Barnoud, Chim. Biochim. Lignine, Cellulose, Hemicelluloses, Actes Symp. Inter. Grenoble, France, 1964, стр. 255.
271. T. Higuchi, F. Barnoud, J. Japan Wood Res. Soc., **12**, 36 (1966).
272. B. Holmberg, Ing. Vetenskaps Akad. Handl., 1934, No. 131.
273. R. H. J. Creighton, J. L. McCarthy, H. Hibbert, J. Am. Chem. Soc., **63**, 3049 (1941).
274. R. H. J. Creighton, R. D. Gibbs, H. Hibbert, Там же, **66**, 32 (1944).
275. R. H. J. Creighton, H. Hibbert, Там же, **66**, 37 (1944).
276. K. Freudenberg, W. Lautsch, K. Engler, Ber., **73B**, 167 (1940).
277. B. Leopold, I.-L. Malmstrom, Acta chem. scand., **6**, 49 (1952).
278. G. H. N. Towers, R. D. Gibbs, Nature, **172**, 25 (1953).
279. С. М. Манская, ДАН, **54**, 611 (1946).
280. С. М. Манская, М. Н. Кочнева, Там же, **62**, 505 (1948).
281. С. М. Манская, Тр. Биогеохим. лаб., **10**, 98 (1954).
282. S. M. Manskaja, Proc. Intern. Congr. Biochem., 4th, Vienna, 1958, **2**, 215 (Pub. 1959).
283. K. Kratzl, J. Eibl, Mitt. Österr. Ges. Holzforsch., **3**, 77 (1951).
284. В. М. Резников, Н. Ф. Сорокина, Ж. прикл. химии, **41**, 176 (1968).
285. К. К. Лебедев, О. И. Черняева, М. А. Ракитина, З. Н. Железнякова, Сб. тр. ЦНИИПИ лесохим. пром-сти, 1965, вып. 16, 259.
286. R. Ripa, L. M. Borguez, Scientia, **34**, No. 133, 36 (1967).
287. J. E. Stone, M. J. Blundell, K. G. Tanner, Canad. J. Chem., **29**, 734 (1951).
288. K. Freudenberg, J. Torres-Serres, Lieb. Ann. Chem., **703**, 225 (1967).

Институт органической химии АН СССР
им. Н. Д. Зелинского, Москва