

УДК 547.934

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДЕГРАДАЦИЯ ЛИГНИНА

О. П. Грушников и О. Н. Антропова

Вопросы микробиологической деградации лигнина, тесно связанные с решением ряда важных теоретических и практических проблем, в последние годы привлекают пристальное внимание исследователей. В статье дан анализ последних работ в этом направлении. Особое внимание уделено критическому рассмотрению гипотез о возможных путях микробиологической деградации лигнина.

Настоящий обзор является первой в отечественной литературе попыткой обобщения данных, относящихся к проблеме микробиологической деструкции лигнина.

Библиография — 151 наименование.

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	935
II. Дереворазрушающие грибы	936
III. Превращения природного и изолированных лигнинов под действием дереворазрушающих грибов	938
IV. Низкомолекулярные продукты микробиологической деградации лигнина	943
V. Микробиологическая деградация фенольных соединений, структурно родственных лигнину. Возможные направления микробиологической деградации лигнина	946

I. ВВЕДЕНИЕ

Микробиологическая деградация растительных материалов, важной составной частью которых является лигнин, играет существенную роль в кругообороте углерода в природе. За последние 10—15 лет широкое развитие получили исследования деструкции лигнина в результате воздействия микроорганизмов^{1—14}, которая в значительной степени отличается от деструкции других растительных компонентов. Эти исследования тесно связаны с работами в ряде важных направлений, из которых следует отметить: 1) гумусообразование и проблема плодородия почвы (см. обзоры^{12, 15—17}); 2) образование торфа и каменного угля; 3) консервация древесины при хранении (см. обзор¹⁸); 4) возможность использования пораженной грибами древесины; 5) метаболизм растений людьми и животными; 6) использование мицелия гриба для накопления белковых продуктов; 7) делигнификация растительного сырья с целью разработки рациональных методов получения целлюлозы; 8) устранение загрязнения водоемов лигнинсодержащими отходами (см. обзоры^{19, 20}).

Нет необходимости говорить о большом научном и практическом значении перечисленных исследований. Кроме того, в последнее время в результате исследования микробиологической деструкции лигнина получена ценная информация о его строении, что позволяет рассматривать микробиологическое воздействие в качестве одного из перспективных методов исследования лигнина.

Несмотря на важность указанных работ, в последней монографии по химии лигнина²¹ вопросам его микробиологической деструкции уделено неоправданно мало внимания. Более того, в отечественной химической литературе отсутствуют обзоры по этому направлению науки.

В связи с обширностью и разнообразием материала здесь не могут быть рассмотрены все указанные аспекты микробиологической деградации лигнина. Основное внимание в последующем изложении будет уделено тем исследованиям, которые привели к получению информации о строении природного, т. е. из изолированного из растительной ткани лигнина.

II. ДЕРЕВОРАЗРУШАЮЩИЕ ГРИБЫ

В связи с тем, что задачи настоящего обзора ограничены анализом результатов исследований микробиологической деградации лигнина, имевших значение для установления его строения, из различных биологических агентов, вызывающих разрушение лигнина (дереворазрушающие грибы, микроорганизмы почвы и воды, кишечные бактерии), будут рассмотрены лишь дереворазрушающие грибы, действие которых на древесину, лигнин и его модельные соединения достаточно широко изучено.

Большинство грибов, вызывающих гниение древесины, относится к одному из классов высших грибов — базидиомицетам (*Basidiomycetes*), имеются также некоторые дереворазрушающие грибы, относящиеся к классу аскомицетов (*Ascomycetes*). Различают два основных типа дереворазрушающих грибов, обозначаемых обычно как бурая гниль и белая гниль. При поражении древесины бурой гнилью преимущественно разрушаются целлюлоза и другие углеводные компоненты, в то время как лигнин сохраняется в относительно неизменном состоянии и гниющая древесина приобретает коричневый цвет. При поражении белой гнилью разрушению подвергаются все компоненты древесины и по мере гниения остаток становится более светлым по сравнению со здоровой древесиной. Список видов грибов, относящихся к этим двум группам, приведен в работах^{1, 22}, кроме того, в обзоре Ноблес²³ дана подробная характеристика 126 видов дереворазрушающих грибов.

В 1928 г. Бавендамм²⁴ обнаружил, что грибы белой гнили при культивировании на агаровой среде, содержащей галловую или таниновую кислоты, продуцируют темноокрашенную зону вокруг и внизу мицелиальных пленок, в то время как грибы бурой гнили не образуют окрашенной зоны. Эта реакция, получившая название реакции Бавендамма, позднее широко использовалась для отнесения разрушающих древесину грибов. Бавендамм связывал способность грибов деградировать лигнин с продуцированием фенолоксидазы. Этот вывод нашел подтверждение в результате исследования Девидсона и сотр.²⁵, которые испытали 210 видов дереворазрушающих грибов на реакцию Бавендамма и установили, что 96% грибов белой гнили продуцировали окрашенные зоны, а 80% грибов бурой гнили не давали их.

Значительное число исследований^{23, 26-31} было посвящено определению ферментов, катализирующих окисление простых фенольных соединений до хинонов, которые полимеризуются, образуя окрашенные комплексы в пробе Бавендамма. Отмечалось, что ферментами, ответственными за эту реакцию, является лакказа *²⁷⁻²⁹; тирозиназа **^{28, 29} и пероксидаза ***³¹, однако полной определенности в этом вопросе пока нет.

Следует отметить, что до сих пор не проводилось систематических исследований ферментов дереворазрушающих грибов. Имеющиеся в ли-

* O_2 : *p*-дифенол — оксидоредуктаза (*p*-дифенолоксидаза), КФ 1.10.3.2.

* O_2 *o*-дифенол — оксидоредуктаза (*o*-дифенолоксидаза), КФ 1.10.3.1.

*** Донор : H_2O_2 — оксидоредуктаза, КФ 1.11.1.7.

тературе сведения носят общий характер и часто противоречивы. Исследования, проведенные в этом направлении, подробно рассмотрены в монографиях Шуберта⁷ и Шивриной³². Установлено, что грибы белой гнили продуцируют два основных фермента: лакказу и тирозиназу. Кроме того, Лир показал, что 14 из 182 исследованных видов дереворазрушающих грибов продуцируют пероксидазу³³ и предложил метод ее обнаружения³⁴. Указанные ферменты катализируют отщепление электронов от фенольных субстратов. В случае лакказы и пероксидазы от субстрата удаляется один восстановительный эквивалент, а в случае тирозиназы— одновременно два восстановительных эквивалента.

Поскольку разрушающие лигнин грибы белой гнили в большинстве случаев продуцируют внеклеточные фенолокисляющие ферменты, в то время как таксономически родственные им грибы бурой гнили, не продуцирующие этих ферментов, не разрушают лигнин, представлялась очевидной связь между способностью деградировать лигнин и фенолоксидазной активностью дереворазрушающих грибов^{23, 31, 35-37}. Однако в последнее время показано, что грибы бурой гнили продуцируют внутриклеточные фенолокисляющие ферменты: тирозиназу и фермент лакказного типа³⁸⁻⁴³, а также пероксидазу⁴⁴. Кроме того, имеются указания⁴⁵⁻⁵⁰, что деградация лигнина вызывается ферментами, не являющимися фенолоксидазами. В связи с этим Кирк и Келлман⁵¹ предприняли исследование 18 различных грибов белой и бурой гнили на способность деградировать лигнин и продуцировать внеклеточную фенолоксидазу, способную окислять простые фенольные соединения. Среди исследованных видов грибов были «типовые» и «нетипичные» грибы белой и бурой гнили. Результаты проведенного исследования показали, что неспособность дереворазрушающих грибов окислять фенолы в агаровой среде нельзя принимать за доказательство невозможности утилизировать лигнин.

Таким образом, до настоящего времени роль фенолоксидаз в биодеградации лигнина остается неопределенной. Результаты рассмотренных выше исследований^{31, 43, 44, 51} свидетельствуют о том, что как деструктирующие лигнин грибы белой гнили, так и не разрушающие лигнин грибы бурой гнили продуцируют фенолокисляющие ферменты, причем некоторые грибы бурой гнили выделяют больше фенолоксидаз, чем некоторые грибы белой гнили. Исходя из этого можно заключить, что если фенолокисляющие ферменты грибов белой гнили не действуют на лигнин иначе, чем фенолокисляющие ферменты грибов бурой гнили, то указанные различия в способности обоих групп грибов деструктировать лигнин могут зависеть от наличия некоторых других энзиматических систем.

Результаты микроскопических исследований⁵²⁻⁵⁸ показали, что микробиологическое разрушение древесной ткани начинается с люменов клеток, в которых локализуются гифы грибов, и распространяется к району срединной пластинки. В частности, Шмид и Лиезе⁵⁷ в ходе электронномикроскопического анализа установили, что древесное вещество удаляется по существу послойно и это вызывает постепенное утоньшение клеточных стенок. В то же время лигнин в срединной пластинке и в углах клеток, по-видимому, относительно устойчив к энзиматической атаке. С другой стороны, Вилкокс⁵⁸ установил, что действие целлолитических ферментов гриба белой гнили *Polyporus versicolor* первоначально ограничено поверхностями клеточных стенок, соседних с люменом, а затем по мере удаления целлюлозы последовательно распространяется на другие слои клеточной стенки. В то же время целлолитические ферменты гриба бурой гнили *Poria monticola* и лигнинразрушаю-

щие ферменты грибов белой гнили способны проникать и действовать внутри клеточной стенки. Эти различия в целлолитических ферментах автор связывал с их молекулярным размером и химическими свойствами.

Следует отметить, что хотя основные закономерности разрушения древесины различными видами грибов бурой гнили являются общими, однако в действии каждого вида имеются особенности, обусловленные различной ферментативной активностью⁵⁹. Это определяет различия в скорости разрушения древесины различными видами грибов бурой гнили.

III. ПРЕВРАЩЕНИЯ ПРИРОДНОГО И ИЗОЛИРОВАННЫХ ЛИГНИНОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ДЕРЕВОРАЗРУШАЮЩИХ ГРИБОВ

Исследования изменений лигнина под действием дереворазрушающих грибов проводились либо на препаратах, выделенных после инкубации различных изолированных лигнинов с грибами белой гнили в синтетических жидких культуральных средах, либо на препаратах, экстрагированных нейтральными растворителями из древесины, подвергшейся действию белой гнили. В большинстве случаев препараты, выделенные из жидких культуральных сред и из подвергшейся гниению древесины, претерпевают аналогичные изменения по сравнению с исходным контрольным лигнином (ср. табл. 1 и 2) и поэтому могут рассматриваться одновременно. Следует однако иметь в виду⁶⁰, что 1) регенерация и очистка препаратов после инкубации изолированных лигнинов с микроорганизмами может привести к ряду дополнительных изменений и 2) лигнин, выделенный из подвергшейся гниению древесины, может отличаться от контрольного препарата не только вследствие изменений, вызываемых действием грибов, но и за счет метода выделения, который обычно отличается от метода выделения контрольного препарата.

В результате исследования действия на еловую древесину различных грибов бурой гнили установлено, что нитробензольное окисление разрушенной древесины дает более низкий выход ванилина по сравнению со здоровой древесиной⁶¹. Леопольд⁶² провел исследование продуктов нитробензольного окисления древесины на различных стадиях ее разрушения грибами бурой гнили и наблюдал последовательное уменьшение их выхода, хотя продукты окисления содержали те же альдегиды и практически в той же пропорции, что и продукты окисления здоровой древесины. По мнению автора, уменьшение выхода ванилина связано с предпочтительной энзиматической атакой на «открытые», т. е. неконденсированные в положении 5 ароматического ядра, структуры лигнина, которые являются основным источником ванилина при нитробензольном окислении. Уменьшение выхода ванилина при нитробензольном окислении сосновой древесины, разрушенной грибами бурой гнили, отмечалось также Энквистом и сотр.⁶²

Хигучи и сотр.⁶³ исследовали препараты лигнина, выделенные из древесины буков, подвергнутой действию различных грибов бурой и белой гнили в течение 5 месяцев. Авторы установили, что суммарный выход альдегидов при нитробензольном окислении пораженной гнилью древесины ниже, чем в случае здоровой древесины, причем этот выход, считая на лигнин, ниже для древесины, подвергшейся действию грибов белой гнили, чем для древесины, подвергшейся действию грибов бурой гнили. Кроме того, в пораженной гнилью древесине по сравнению со здоровой наблюдается увеличение молекулярного соотношения сиреневого альдегида к ванилину в продуктах нитробензольного окисления.

На уменьшение выхода ванилина при нитробензольном окислении изолированных лигнинов, подвергнутых действию грибов белой гнили, указывают также Ишикава, Шуберт и Норд⁶⁴. Авторы исследовали изменения выделенных из древесины сосны и ели нативного лигнина Браунса и лигнина механического размоля (ЛМР) в результате их инкубации с грибами белой гнили. В этих экспериментах было исследовано действие как «богатых фенолоксидазой» (*Polyporus hirsutus*, *Polyporus versicolor* и *Poria subacida* J247), так и «бедных фенолоксидазой» (*Poria subacida* N199, *Fomes fomentarius*, *Fomes annosus* и *Trametes pini*) грибов белой гнили. Установлено, что деструкция лигнина грибами белой гнили приводит к уменьшению количества метоксильных групп и увеличению содержания общих и фенольных гидроксильных, карбонильных и карбоксильных групп (табл. 1).

ТАБЛИЦА 1
Результаты аналитического исследования исходных и подвергшихся действию грибов белой гнили лигнинов * (согласно данным⁶⁴)

Лигнин	Вид гриба	Выход, %	Содержание, %			Содержание, моли на звено лигнина с мол. весом 180			Выход ванилина, %
			С	Н	ОСН ₂	ОН _{Фен.}	СО	СООН	
Сосновый ЛМР	Контроль	—	63,70	6,29	15,5	0,24	0,20	0,024	20,0
	<i>Fomes fomentarius</i>	77,0	61,55	5,77	14,1	0,30	0,27	0,106	15,1
	<i>Polyporus versicolor</i>	61,8	61,41	6,11	10,1	0,32	0,23	0,130	11,0
Сосновый нативный лигнин	Контроль	—	63,85	6,22	14,5	0,32	0,24	0,022	22,6
	<i>Fomes fomentarius</i>	73,5	64,00	6,23	12,1	0,40	0,28	0,125	13,6
	<i>Polyporus versicolor</i>	55,2	64,98	6,08	9,6	0,33	0,20	0,150	10,4

* Культуральные условия: синтетическая жидккая среда, содержащая 1% лигнина; 26—29°; 13 суток

При исследовании ИК-спектров лигнина, подвергшегося действию грибов белой гнили, обнаружено увеличение абсорбции $\sim 1670 \text{ см}^{-1}$. Это увеличение связывалось с накоплением в лигнине конъюгированных карбонильных и (или) конъюгированных карбоксильных групп. Другие исследователи^{65—67} отмечали, что в результате фунгиальной атаки усиливается абсорбция в области $1710—1735 \text{ см}^{-1}$. Эта полоса также отнесена к конъюгированным карбонильным и (или) карбоксильным группам.

Ишикава и Оки⁶⁸ показали, что еловый нативный лигнин под действием H_2O_2 и очищенных препаратов пероксидазы, выделенных из хрена, редьки и комков мицелия *Collybia velutipes* N8, претерпевают изменения, аналогичные рассмотренным выше, за исключением того, что содержание метоксильных групп остается постоянным.

Ишикава и Оки⁶⁹ исследовали изменения, претерпеваемые этанол-лигнином из японского кедра под действием очищенного ферментного раствора, полученного из комков мицелия или свободных от мицелия культуральных фильтратов *Collybia velutipes* N8 и *Polyporus versicolor*. Установлено, что энзиматический гидролиз этанол-лигнина приводит почти к количественному отщеплению этоксильных групп с одновременным увеличением количества спиртовых ОН-групп и к незначительному увеличению содержания фенольных гидроксилов. Изменений в ИК- и УФ-спектрах в результате энзиматического воздействия не наблюда-

лось. Одновременно исследовано превращение ряда ароматических эфирных соединений под действием очищенного ферментного раствора (результаты рассмотрены в разд. V). Полученные данные позволили авторам заключить, что во время фунгиальной атаки энзиматически гидролизуются алкилалкильные и алкиларидные эфирные связи в этанол-лигнине.

ТАБЛИЦА 2

Результаты аналитического исследования елового ЛМР и препаратов лигнина, экстрагированных из еловой древесины, подвергнутой действию *P. subacida* (согласно данным⁶⁶)

Препарат	Выход, % от лигнина разрушенной древесины	Содержание, %			Содержание, моли на звено лигнина с мол. весом 180			
		С	Н	ОСН ₃	ОН _{общ.}	ОН _{фен.}	СО	СООН
ЛМР	—	62,81	5,88	15,24	1,18	0,25	0,14	0,017
ДЛ-І *	1,1	60,44	5,67	12,32	1,42	0,30	0,21	0,053
ДЛ-ІІ **	2,7	58,54	5,23	11,75	1,67	0,40	0,28	0,106
ДЛ-ІІІ ***	—	55,01	4,98	9,69	—	—	0,30	0,113

* Лигнин, экстрагированный смесью ацетон—вода из древесины, подвергнутой действию *P. subacida* в течение 3 месяцев.

** Лигнин, экстрагированный смесью ацетон—вода из древесины, подвергнутой действию *P. subacida* в течение 6 месяцев.

*** Лигнин, экстрагированный водой из древесины, подвергнутой действию *P. subacida* в течение 6 месяцев.

Фукузуми⁷⁰ на основании результатов УФ- и ИК-спектрального исследования нативного лигнина ели и лигнина, экстрагированного ацетоном из еловой древесной муки, подвергнутой действию *Poria subacida*, пришел к выводу о значительном увеличении карбонильных групп в лигнине, подвергшемся энзиматическому воздействию. Хата⁶⁶ исследовал препараты лигнина, экстрагированные из еловой древесины, подвергшейся действию *Poria subacida* BII. По сравнению с еловым ЛМР выделенные препараты содержали меньше метоксильных групп и больше фенольных гидроксильных, карбонильных и карбоксильных групп (табл. 2). Кроме того, установлено, что в результате энзиматического воздействия в лигнине уменьшается количество кониферилальдегидных и гвяцилкарбонильных групп. При нитробензольном окислении деструктированных лигнинов образуется меньше ванилина и больше ванилиновой кислоты (по сравнению с еловым ЛМР), причем по мере увеличения продолжительности энзиматического воздействия эта тенденция усиливается (табл. 3). Однако суммарный выход этих продуктов из деструктированного лигнина ниже, чем из ЛМР. При гидролизе смесью диоксан—вода (180°, 50 мин. и 140°, 60 мин.) деструктированный лигнин по сравнению с ЛМР дает значительно больше ванилиновой кислоты и меньше кониферилового спирта, кониферилового альдегида и ванилина. Кроме того, образуется очень небольшое количество феруловой кислоты, не обнаруживаемой в продуктах гидролиза ЛМР. Исследование свободных радикалов в ЛМР и деструктированных лигнинах показало, что их количество примерно одинаково, но они относятся к различным типам.

ТАБЛИЦА 3

Выход продуктов нитробензольного окисления (% от лигнина) (согласно данным⁶⁶)

Препарат	Ванилиновая кислота	Ванилин
Еловый ЛМР	2,2	24,1
ДЛ-І *	4,8	14,9
ДЛ-ІІ **	6,7	10,2

* Обозначения препаратов те же, что и в табл. 2.

Хата⁶⁶ исследовал препараты лигнина, экстрагированные из еловой древесины, подвергшейся действию *Poria subacida* BII. По сравнению с еловым ЛМР выделенные препараты содержали меньше метоксильных групп и больше фенольных гидроксильных, карбонильных и карбоксильных групп (табл. 2). Кроме того, установлено, что в результате энзиматического воздействия в лигнине уменьшается количество кониферилальдегидных и гвяцилкарбонильных групп. При нитробензольном окислении деструктированных лигнинов образуется меньше ванилина и больше ванилиновой кислоты (по сравнению с еловым ЛМР), причем по мере увеличения продолжительности энзиматического воздействия эта тенденция усиливается (табл. 3). Однако суммарный выход этих продуктов из деструктированного лигнина ниже, чем из ЛМР. При гидролизе смесью диоксан—вода (180°, 50 мин. и 140°, 60 мин.) деструктированный лигнин по сравнению с ЛМР дает значительно больше ванилиновой кислоты и меньше кониферилового спирта, кониферилового альдегида и ванилина. Кроме того, образуется очень небольшое количество феруловой кислоты, не обнаруживаемой в продуктах гидролиза ЛМР. Исследование свободных радикалов в ЛМР и деструктированных лигнинах показало, что их количество примерно одинаково, но они относятся к различным типам.

Кониши и Иноуе⁷¹⁻⁷⁴ показали, что ферменты, продуцируемые в культуральных фильтратах грибом *Coriolus versicolor* переводят ЛМР, выделенный из заболони японской криптомерии, в водорастворимое состояние без существенного изменения его молекулярного веса, однако не разрушают лигнин до низкомолекулярных соединений. По сравнению с исходным ЛМР в водорастворимом лигнине содержится больше СООН-групп и меньше спиртовых ОН-групп. Отмеченные изменения приписаны энзиматической атаке на боковые цепи фенилпропановых звеньев лигнина, которая, очевидно, протекает посредством радикальной реакции.

Стилинк^{75, 76} установил, что воздействие на древесину грибов бурой или белой гнили в 2—3 раза увеличивает содержание в ней свободных радикалов, причем для подвергшейся фунгиальной атаке древесины лиственных пород характерна более высокая концентрация свободных радикалов по сравнению с древесиной хвойных. Эти данные нашли подтверждение в результате исследования, проведенного Крейцберг и соавт.⁷⁷

Ферм и соавт.⁷⁸ исследовали превращения ЛМР из ликвидамбара под действием частично очищенных препаратов пероксидазы хрена и лакказы из *Polyporus versicolor*, а также неочищенного фермента из гриба бурой гнили *Poria cocos*. Эксперименты по энзиматическому окислению лигнина проводили в смеси метилцеллозольв — вода, которая является растворителем для ЛМР и незначительно влияет на стабильность использованных ферментных препаратов. Методом спектроскопии ЭПР показано, что каждый из использованных ферментных препаратов вызывает образование свободных радикалов, которые относятся к феноксильному типу. Образование радикалов аналогичного типа наблюдалось ранее⁷⁹ при инкубации сирингильных соединений с фенолокисляющими ферментами (см. раздел V). Кроме того, авторы⁷⁸ сообщили о предварительных результатах исследования изменений молекулярно-весового распределения лигнина и лигносульфоната под действием фенолокисляющих ферментов. Методом гельпроникающей хроматографии показано, что фенолокисляющие ферменты вызывают увеличение молекулярного веса. На основании этого авторы высказали предположение, что фенолокисляющие ферменты могут участвовать на более поздних стадиях процесса микробиологической деградации, а не в начальных реакциях деполимеризации.

Ишихара и Миязаки⁸⁰ исследовали изменения в молекулярном весе кленового ЛМР в результате инкубации с лакказой В, полученной из культурального фильтрата *Polyporus versicolor*, и на основании полученных результатов пришли к выводу, что этот фермент обладает функциями полимеризации и деполимеризации лигнина, причем первая функция доминирует.

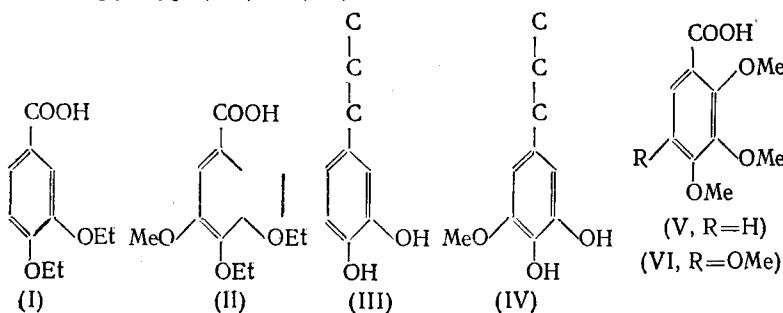
Кирк и Лундквист⁶⁷ провели сравнительное исследование препаратов ЛМР, выделенных из здоровой и подвергшейся действию *Polyporus versicolor* (потеря веса 32%) заболонной части древесины ликвидамбара. Установлено, что эти препараты не имеют ясно выраженных различий в отношении элементного состава и содержания ОСН₃-групп, УФ- и ИК-спектров, Д_ε-кривых и кривых молекулярно-весового распределения, а также состава этоксибензойных кислот, образующихся при деградации лигнина методом этилирования — окисления⁸¹. Полученные результаты свидетельствуют о том, что лигнин, выделяемый из подвергшейся гниению древесины методом механического размола (выход 27%), не претерпевает существенных изменений. Это, однако, не позволяет сделать заключения о степени измененности всего оставшегося в разрушенной древесине лигнина. Тем не менее авторы высказали предположение,

что при разрушении древесины грибом *P. versicolor* ограниченная часть лигнина подвергается энзиматическому воздействию и удаляется, прежде чем гниение распространяется на другую часть лигнина.

Кирк и Лундквист исследовали также вещества, экстрагированные из здоровой и подвергшейся гниению древесины смесью бензол — этанол (2:1) и затем 96%-ным этанолом (выход их составил 3,3 и 3,6% от древесины соответственно). Полученные в результате гель-фильтрации на сепадексе G-25 высокомолекулярные (молекулярный вес >400) фракции (т. н. «экстрактивный лигнин») исследовали методом УФ- и ИК-спектроскопии. Результаты проведенных экспериментов показали, что эти препараты относятся к лигнину и позволили обнаружить различия между экстрактивным лигнином из здоровой и подвергшейся гниению древесины. В ИК-спектре лигнина, экстрагированного из подвергшейся гниению древесины, обнаружена значительная абсорбция при 1730 cm^{-1} . Установлено, что эта полоса обусловлена химическими изменениями, вызываемыми действием грибов, а не присутствием нелигниновых примесей. Указанную полосу не удалось точно отнести, хотя авторы полагают, что абсорбция в этой области может быть связана с неконъюгированными карбонильными группами или неконъюгированными карбоксильными группами. Интересно отметить, что изменения лигнина, приводящие к возникновению полосы при 1730 cm^{-1} в его ИК-спектре, не сопровождаются заметными изменениями в УФ-спектре. Это, очевидно, свидетельствует о том, что при энзиматическом воздействии не образуются в заметном количестве хромофорные системы, спектральные свойства которых значительно отличаются от свойств первоначально присутствовавших в лигнине хромофоров (арил-конъюгированные карбоксильные группы, арил-конъюгированные карбонильные группы, *p*-бензохиноидные остатки и др.).

в последнее время получены интересные результаты при исследовании лигнина, остающегося после воздействия на древесину грибов бурой гнили (т. н. энзиматически освобожденный лигнин), методами окислительной деградации.

Согласно данным ряда исследователей^{60, 62, 82-87}, воздействие на лигнин грибов бурой гнили значительно понижает содержание в нем метоксильных групп. Кирк и Адлер^{81, 88} предприняли исследование структурных изменений, приводящих к уменьшению содержания OCH_3 -групп. Авторы исследовали лигнин, энзиматически освобожденный из древесины ликвидамбара действием гриба бурой гнили *Lenzites trabea*. Предварительно этилированные препараты лигнина подвергли окислительной деградации. Образующиеся этоксибензойные кислоты идентифицировали методом газовой хроматографии — масс-спектрометрии. В продуктах деструкции энзиматически освобожденного лигнина обнаружены кислоты (I) и (II), что свидетельствует о наличии в нем о-ди-фенольных структур (III) и (IV).



Эти структуры образуются путем фунгиального деметилирования лигнинных звеньев гвяцилового и сиригильного типа соответственно. Кроме того, Кирк и Адлер подвергли препарат энзиматически освобожденного лигнина кипчению с 0,2 M раствором HCl в смеси диоксан—вода (эта обработка приводит к расщеплению алкиларильных эфирных связей с образованием фенольных OH-групп). Последующее этилирование и окислительная деградация дали более высокие выходы кислот (I) и (II). Таким образом, при фунгиальной атаке происходит деметилирование не только звеньев со свободным фенольным гидроксилом. Однако нефенольные звенья деметилируются в меньшей степени, чем соответствующие фенольные. Установлено также, что и фенольные, и нефенольные структуры сиригильного типа деметилируются более интенсивно, чем соответствующие структуры гвяцилового типа. Предпочтительное деметилирование звеньев сиригильного типа, очевидно, объясняется тем, что они имеют две метоксильные группы и в силу этого деметилирующая энзиматическая система имеет большую возможность вступить в контакт с ними.

Таким образом, *Lenzites trabea* деметилирует как свободные, так и этерифицированные звенья гвяцилового и сиригильного типа в лигнине. По мнению авторов^{81, 88}, деметилирование может происходить в результате прямого окисления метильной группы, которая затем элиминируется в виде формальдегида, оставляя свободную фенольную OH-группу.

Кирк, Ларссон и Микше⁸⁹ провели сравнительное исследование метоксилированных ароматических карбоновых кислот, образующихся при деградации энзиматически освобожденного лигнина и ЛМР ликвидамбара согласно методу⁹⁰⁻⁹². Среди продуктов деградации энзиматически освобожденного лигнина идентифицированы кислоты (V) и (VI), которые образуются из структур, гидроксилированных в результате фунгиального воздействия. Гидроксилирование происходит в положение орто по отношению к боковой цепи фенилпропановых звеньев лигнина. Однако пока неизвестны ни механизм этого процесса, ни то, какие звенья лигнина претерпевают гидроксилирование (исходные гвяциловые и сиригильные или же вновь образующиеся о-дифенольные).

IV. НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПРОДУКТЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДЕГРАДАЦИИ ЛИГНИНА

Хендерсон⁹³ показала, что 6-месячная инкубация предварительно проэкстрагированных еловых и березовых опилок с грибами белой гнили *Polystictus versicolor* и *Trametes pini* приводила к освобождению ванилиновой кислоты в первом случае и смеси ванилиновой и сиреневой кислоты — во втором. Хигути и сотр.⁶³ сообщили о наличии в спирто-бензольном экстракте древесной муки бук, пораженной грибами белой гнили, кониферилового альдегида, ванилина и сиреневого альдегида. Фукузуми⁷⁰ исследовал продукты энзиматической деградации нативного лигнина ели грибом *Poria subacida* методом хроматографии на бумаге и сообщил о наличии 4-окси-3-метоксифенилпироноградной кислоты. Кроме того, в ацетоновых и метиленхлоридном экстрактах еловой древесной муки, разрушенной тем же грибом, обнаружен гвяцилглицерин-β-конифериловый эфир и соединение, подобное ванилиновой кислоте.

Обширное исследование низкомолекулярных продуктов энзиматической деградации лигнина осуществили Ишикава, Шуберт и Норд⁶⁴. Они подвергли выделенные из древесины сосны и ели препараты нативного

лигнина (НЛ) и ЛМР инкубации с различными грибами белой гнили в жидких культуральных средах. Кислые фракции эфирных экстрактов продуктов деградации лигнина исследовали методом хроматографии на бумаге. Идентифицированные продукты приведены в табл. 4.

ТАБЛИЦА 4

Низкомолекулярные продукты, образующиеся при действии на сосновый и еловый лигнин грибов белой гнили * (согласно данным ⁶⁴)

	Ванилиновая кислота	<i>p</i> -Оксибензоная кислота	Феруловая кислота	4-Окси-3-метоксифенилпироноградная кислота (енольный таутомер)	<i>p</i> -Оксикоричная кислота	Гвайциллициерин	Ванилин	Дегидрованилин	Конифериловый альдегид	<i>p</i> -Оксикоричный альдегид	Гвайциллициерин-β-конифериловый эфир
Значение R_f	0,08 0,12	0,11 0,12	0,17 0,18	0,18 0,19	0,22 0,24	0,42 0,44	0,45 0,47	0,53 0,55	0,60 0,61	0,66 0,68	0,80 0,82
A ** НЛ ЛМР	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	(?)
В *** НЛ ЛМР	++	++	+	+	++	+	++	+	++	+	++
контроль****	+	++	++	+	++	+	+	+	+	+	++

* Условия: культуральная среда, содержащая 1% лигнина, 27°, 28 дней. Растворитель для хроматографии на бумаге — бутанол, насыщенный 3%-ным аммиаком.

** А — богатые фенолоксидазой виды (*Polyporus hirsutus*, *Polyporus versicolor* и *Poria subacida* J247)

*** В — бедные фенолоксидазой виды (*Poria subacida* N199, *Fomes fomentarius*, *Fomes annosus* и *Trametes pinii*)

**** Среда без лигнина после деградации грибами групп А или В

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что феруловая кислота, 4-окси-3-метоксифенилпироноградная кислота, гвайциллициерин и его конифериловый эфир, по-видимому, более легко метаболизируются богатыми фенолоксидазой микроорганизмами (группа А) по сравнению с другими промежуточными соединениями. Наличие в продуктах энзиматической деградации лигнина гвайциллициерин-β-кониферилового эфира, а также образование кониферилового альдегида, α -оксипропионавинилона и ванилоилметилкетона при ацидолизе фенольной фракции продуктов деградации лигнина, по мнению авторов, является доказательством наличия в лигнине гвайциллициерин-β-кониферилэфирных звеньев.

Как отмечалось выше, Кирк и Лундквист ⁶⁷ экстрагировали здоровую и подвергшуюся действию *Polyporus versicolor* древесину заболонной части ликвидамина смесью бензол — этианол (2:1) и затем 96%-ным этианолом. Экстрагированные продукты подвергли гель-фильтрации на сепадексе G-25 и полученную низкомолекулярную (монаомерную) фракцию разделяли хроматографией на бумаге. В мономерной фракции экстрактивных веществ из подвергшейся гниению древесины идентифицированы ванилин, сиреневый альдегид, ванилиновая и сиреневая кислоты, конифериловый и синаповый альдегиды. Поскольку те же вещества и примерно в тех же количествах найдены и в экстрактивных продуктах из здоровой древесины, авторы полагают, что их образование нельзя приписать фунгиальной атаке. Очевидно, образование низкомолекулярных соединений происходит в результате гидролиза во время гниения, а не в результате разрушения фенилпропановых звеньев лигнина.

Кирк и Лундквист предприняли попытку обнаружить в мономерной фракции веществ, экстрагированных из подвергшейся гниению древесины, гвяцилглицерин, сирингилглицерин и 4-окси-3-метоксифенилпиро-виноградную кислоту, т. е. те соединения, которые были идентифицированы Ишикавой и соавт.⁶⁴ среди продуктов энзиматической деградации лигнина. Эти соединения не были найдены, что, по мнению Кирка и Лундквиста, требует внесения корректива в результаты более ранних исследований. Однако, поскольку *P. versicolor* относится к богатым фенол-оксидазой видам грибов белой гнили, результаты Кирка и Лундквиста не противоречат данным Ишикавы и соавт. (см. табл. 4).

Ишихара и Миязаки⁸⁰ инкубировали кленовый ЛМР с препаратом лакказы В, полученным из культурального фильтрата гриба *Polyporus versicolor* в течение 4 суток при 30°. Среди низкомолекулярных продуктов деградации лигнина идентифицирован 2,6-диметокси-*p*-бензохинон, образование которого наблюдалось ранее при энзиматической деградации ряда модельных соединений⁶⁴ (см. раздел V).

Антропова и соавт.⁹⁵ исследовали 548 штаммов дереворазрушающих грибов, относящихся к различным таксономическим группам*. В этих экспериментах в качестве единственного источника углерода использовали сульфатный лигнин осины. Результаты хроматографического исследования мономерных продуктов деградации лигнина позволили отметить некоторую специфичность в действии исследованных грибов. Так, в культурах видов *Mucor* преобладали альдегиды и некоторые кислоты, в то время как основными продуктами метаболизма грибов видов *Trichoderma* были кетоны, бензойная и ванилиновая кислоты. Виды *Aspergillus* продуцировали конифериловый альдегид, *p*-оксибензальдегид, дегидродиванилин, кетоны и кислоты, в том числе некоторые кислоты не обнаруженные у видов *Mucor* и *Trichoderma*. В продуктах метаболизма грибов видов *Penicillium* и *Fusarium* обнаружены спирты, отсутствовавшие в случае грибов видов *Mucor*, *Trichoderma* и *Aspergillus*, а также фенолы, некоторые альдегиды, кетоны и кислоты.

В результате изучения лигнинразрушающих свойств микромицетов выявлено два наиболее активных штамма: *Mucor* sp. 15157 и *Penicillium* sp. 50311, обладающих соответственно лакказной и фенолазной активностями⁶⁶.

При деградации лигнина *Mucor* sp. 15157 в культуральной жидкости были обнаружены следующие продукты: *p*-оксибензойная, бензойная, *p*-оксикурочная, ванилиновая, сиреневая, синаповая, протокатеховая, гомопротокатеховая, коричная, 3-метокси-4-оксифенилпиро-виноградная и феруловая кислоты, ванилин, протокатеховый альдегид и ряд неидентифицированных веществ. При определении количественного выхода основных продуктов распада лигнина *p*-оксибензойная кислота обнаружена на 7—12 сутки роста гриба в количестве 0,4%, на 18-е сутки ее выход достиг 2,0%. Ванилиновая кислота появилась на 7-е сутки в количестве 0,06%, содержание ее постепенно увеличивалось и на 20-е сутки достигло 0,13%, а на 23-и сутки резко возросло и стало равным 3,5%, затем упало и колебалось в пределах 0,06—0,1%. Сиреневая кислота появилась только на 28-е сутки в количестве 0,04—0,1%. Выход остальных веществ колебался в пределах 0,04—0,1%.

При деградации лигнина *Penicillium* sp. 50311 в культуральной жидкости обнаружены: *p*-оксибензойная, бензойная, ванилиновая, 3-метокси-4-оксифенилпиро-виноградная и феруловая кислоты, синаповый аль-

* Часть исследованных видов *Mucor*, *Aspergillus* и *Penicillium* являются почвенными грибами и неспособны самостоятельно разрушать древесину.

дегид, ванилиловый спирт, 3-оксифенилпропанол-1, гвяцилпропанол-3 и -2, пирогаллол и фенол. В культуральной жидкости постепенно нарастало количество ванилиновой кислоты: ее содержание на 10-е сутки составило 0,09 %, достигало максимального уровня на 18-е сутки — 0,89 %, а затем постепенно падало; то же происходило с *p*-оксибензойной кислотой: на 3-и сутки — 0,06 %, а на 30-е сутки — 0,5 %, затем ее содержание уменьшалось. Сиреневая кислота на 30-е сутки достигла максимального количества — 3,5 %, а затем ее содержание падало до 0,06 %.

V. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДЕГРАДАЦИЯ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ, СТРУКТУРНО РОДСТВЕННЫХ ЛИГНИНУ. ВОЗМОЖНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДЕГРАДАЦИИ ЛИГНИНА

Рассматриваемые ниже исследования энзиматических превращений фенольных соединений структурно родственных лигнину привели к получению информации, которая позволила высказать предположения о механизмах превращений лигнина в ходе фунгиальной атаки.

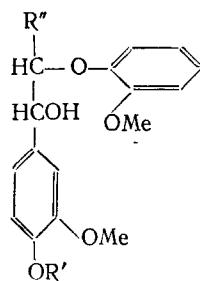
Минами и Фукузуми⁹⁷ еще в 1956 г. указали на восстановительную функцию *Polystictus sanguines*, обнаружив бензальдегид в продуктах метаболизма бензойной кислоты. Позднее Фукузуми и сотр.⁹⁸ сообщили о восстановительном превращении вератровой кислоты до вератрового альдегида в результате инкубации с *P. sanguines*.

Хендерсон и соавт.⁹⁹ исследовали превращения некоторых ароматических кислот под действием *Polystictus versicolor* и показали, что эти грибы продуцируют внеклеточную спиртовую дегидрогеназу. *P. versicolor* восстанавливала *m*- и *p*-метоксибензойную, вератровую и β -нафтоинную кислоты до соответствующих альдегидов и спиртов. Только спирты были обнаружены среди продуктов энзиматических превращений *o*-метоксибензойной и бензойной кислот. Соответствующие спирты были получены также из *o*- и *p*-оксибензальдегидов. 2,4-Диметоксибензойная, фенилуксусная и α -нафтоинная кислоты не восстанавливались. Скорость реакции изменялась в зависимости от положения и природы заместителя в ароматическом кольце. Кроме того, показано, что 2,4-диметоксибензойная, *o*-, *m*- и *p*-метоксибензойные кислоты в незначительной степени деметилировались до соответствующих оксисоединений, а коричная, бензойная, фенилуксусная кислоты гидроксилировались в *p*-положение, причем две последние только в ограниченной степени. Отмечена некоторая деградация ароматической структуры, которая имела место во время метаболизма коричной, β -нафтоинной, *p*- и *o*-оксибензойных кислот.

Шимазоно и Норд¹⁰⁰ установили, что *P. versicolor* в аэробных условиях восстанавливает *p*-метоксибензойную кислоту до соответствующего альдегида и спирта. Раман и Шанмугасундарам¹⁰¹ сообщили, что культуры гриба *Aspergillus niger* в присутствии глюкозы превращают до 50 % бензойной кислоты, 35 % *o*-аминобензойной кислоты и 10 % *p*-амиnobензойной кислоты в соответствующие альдегиды. *o*- и *p*-Оксибензойные кислоты не восстанавливались в альдегиды. Кроме того, в анаэробных условиях наблюдалось восстановление бензальдегида до бензилового спирта, однако другие альдегиды не претерпевали аналогичного превращения.

Хендерсон и соавт.¹⁰² установили, что *Polystictus versicolor* продуцирует внеклеточную спиртовую оксидазу, которая способна окислять первичные ароматические спирты (бензиловый спирт и его *p*-метокси, *m*-метокси, 3,4-диметокси, 4-окси-3-метокси, *o*-окси- и *p*-окси-производные; 4-окси-3-метоксикоричный спирт, β -нафтилкарбинол) до соответствую-

ших альдегидов и не окисляет вторичные спирты [1-(3,4-диметоксифенил)этанол, 1-(4-окси-3-метоксифенил)этанол, 1-(4-метоксифенил)этанол].



(VII; R'=R''=H)

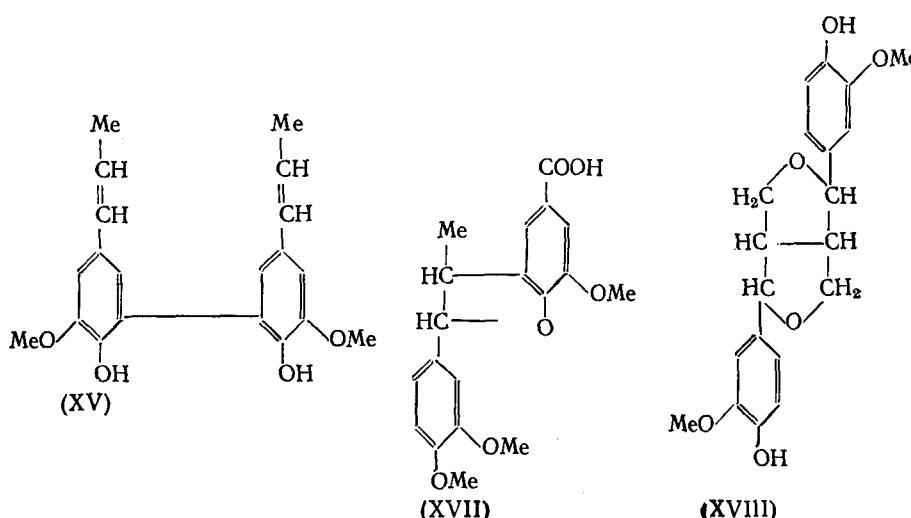
(VIII; R'=H; R''=CH₂OH)(IX, R'=CH₃; R''=H)(X, R'=CH₃; R''=CH₂OH)

В ходе исследования фунгиального метаболизма модельных соединений лигнина Хендерсон и соавт.¹⁰³ установили, что мицелиальные пленки *P. versicolor* метаболизировали гвяцилгликоль- β -гвяциловый эфир (VII) и гвяцилглицерин- β -гвяциловый эфир (VIII), но не метаболизировали вератрилгликоль- β -гвяциловый эфир (IX) и вератрилглицерин- β -гвяциловый эфир (X). Авторами отмечена способность гриба метилировать фенольные OH-группы. Так, в результате метаболизма соединения (VII) образовывался вератровый спирт. Вератровый альдегид и вератровый спирт образовывались также в результате метаболизма *p*-оксибензойной кислоты, протокатеховой кислоты, ванилина и ванилилового спирта. Ни одно из соединений (VII) — (X) не окислялось внеклеточной спиртовой оксидазой *P. versicolor*.

Ишихара и Миязаки¹⁰⁴ подвергли ванилиновую кислоту действию неочищенного фермента из *P. versicolor* и выделили из реакционной смеси желтый кристаллический продукт с т. п. 225—226°. На основании исследования УФ-, ИК-, ЯМР- и масс-спектров, а также анализа продуктов окислительной деградации установлено, что это соединение является 2-метокси-6-(2'-метокси-4'-карбоксифенокси)-1,4-бензохиноном¹⁰⁵.

На основании результатов исследования энзиматической деградации лигнина Фукузуми^{70, 106} высказал предположение о том, что лигнин разрушается через гвяцилглицерин- β -эфирные соединения, β -оксиконифериловый спирт и 4-окси-3-метоксифенилпировиноградную кислоту ферментами *Poria subacida*. Фукузуми полагал, что соединения, подобные ванилиновой кислоте, образуются в результате расщепления боковой цепи гвяцилпропанонов действием оксидазы грибов. Автором подтверждено наличие гомогентизиновой кислоты в среде *P. subacida*.

Ишикава, Шуберт и Норд¹⁰⁷ исследовали превращения ряда родственных лигнину ароматических соединений в результате действия *Polyporus versicolor* и *Fomes fomentarius*, относящихся соответственно к богатым и бедным фенолоксидазой видам грибов белой гнили. В качестве субстратов использовали ванилиловый спирт (XI), гвяцилметилкарбинол, 4-окси-3-метоксифенилпировиноградную кислоту (XII), конифериловый альдегид (XIII), конифериловый спирт (XIV), дегидродинозевгенол (XV), гвяцилглицерин (XVI) и его β -гвяциловый эфир (VIII) и некоторые вератровые и *p*-оксифенильные аналоги этих соединений, а также кислоту Эрдтмана (XVII), пинорезинол (XVIIa) и симплокосигенол (XVIIIb).



В результате проведенных исследований установлено, что в общем случае гвяцильные соединения быстро метаболизировались, в то время как *p*-оксифенильные соединения в тех же условиях были несколько более устойчивы к фунгиальной атаке. Особенно быстро метаболизировались *p*-оксикоричная, *p*-оксифенилпировиноградная, феруловая и 4-окси-3-метоксифенилпировиноградная кислоты, конифериловый альдегид, конифериловый спирт, изоэвгенол и гвяцилглицерин. После инкубации этих соединений с *P. versicolor* в течение 4–5 дней только небольшие количества субстрата обнаруживались в фильтратах. Однако количество продуктов метаболизма, накапливающихся в реакционной среде, было сравнительно невелико. Следует также отметить, что некоторая часть всех использованных соединений превращалась в полимер. *p*-Оксикоричная, *p*-оксифенилпировиноградная, феруловая и 4-окси-3-метоксифенилпировиноградная кислоты, кислота Эрдтмана, конифериловый альдегид, конифериловый спирт, изоэвгенол, дегидродизоэвгенол, симплокосигенол и пинорезинол более легко полимеризовались грибом *P. versicolor*, чем *F. fomentarius*.

Основные продукты метаболизма, образующиеся из испытанных субстратов, приведены в табл. 5.

Основными продуктами энзиматической деградации использованных соединений являются ванилин и ванилиновая кислота, причем выход этих продуктов выше в случае деградации мономеров, а не димеров. Поскольку авторы не сообщали о проведении контрольных экспериментов по инкубации только среды и субстрата, это дало основание предположить¹³, что ванилин и ванилиновая кислота могли образоваться в результате аутоокисления образцов или загрязнения субстратов.

Как *P. versicolor*, так и *F. fomentarius* превращали гвяцилглицерин- β -гвяциловый эфир (VIII) в гвяцилглицерин (XVI) и гвякол. Образавшийся таким образом гвяцилглицерин превращался далее обоими грибами в ванилиновую кислоту через 4-окси-3-метоксифенилпировиноградную кислоту (XII) и ванилин, однако кислота (XII) не обнаружена в культуральной среде *P. versicolor*.

Аналогичные превращения претерпевают *p*-оксифенильные производные (из *p*-оксикоричной и *p*-оксифенилпировиноградной кислот образуются *p*-оксибензальдегид и *p*-оксибензойная кислота, а *p*-оксибензальдегид окисляется до *p*-оксибензойной кислоты).

Одновременно отмечалось, что при энзиматическом воздействии происходит восстановление гвяцильных соединений. В частности, при действии *F. fomentarius* в продуктах метаболизма ванилина, ванилиновой кислоты, ацетованилона и изоэвгенола обнаружен ванилиловый спирт (XI). Кроме того, *p*-оксибензойная, *p*-оксикоричная и феруловая кисло-

ТАБЛИЦА 5

Продукты энзиматической деградации ряда фенольных соединений структурно родственных лигнину (согласно данным¹⁰⁷)

Субстрат	Ванилин (XIX)	Дегидрованилин (XX)	Ванилиновая кислота (XXI)	Феруловая кислота (XXII)	Конифериловый альдегид (XXIII)	4-Окси-3-метоксифенилпирваниноградная кислота (XII)
Ванилин	+++	++	++			
Ванилиловый спирт	+++	++	++			
Ацетованилон	+++	++	++			
Гвяцилметилкарбинол	+++	++	++			
Феруловая кислота	+++	++	++			
4-Окси-3-метоксифенилпирваниноградная кислота	+++	++	++			
Кислота Эрдтмана *	+++	++	++			
Пинорезинол *	+++	++	++			
Симплокосигенол *	+++	++	++			
Дегидроизоэвгенол *	+++	++	++			
Конифериловый альдегид	+++	++	++	+		
Конифериловый спирт	+++	++	++	+	+	
Изоэвгенол	+++	++	++	+		
Гвяцилглицерин	+++	++	++	+		+

* Соединение относительно устойчиво по отношению к фунгиальной атаке.

ты, а также *p*-оксибензальдегид энзиматически превращались в соответствующий альдегид или спирт.

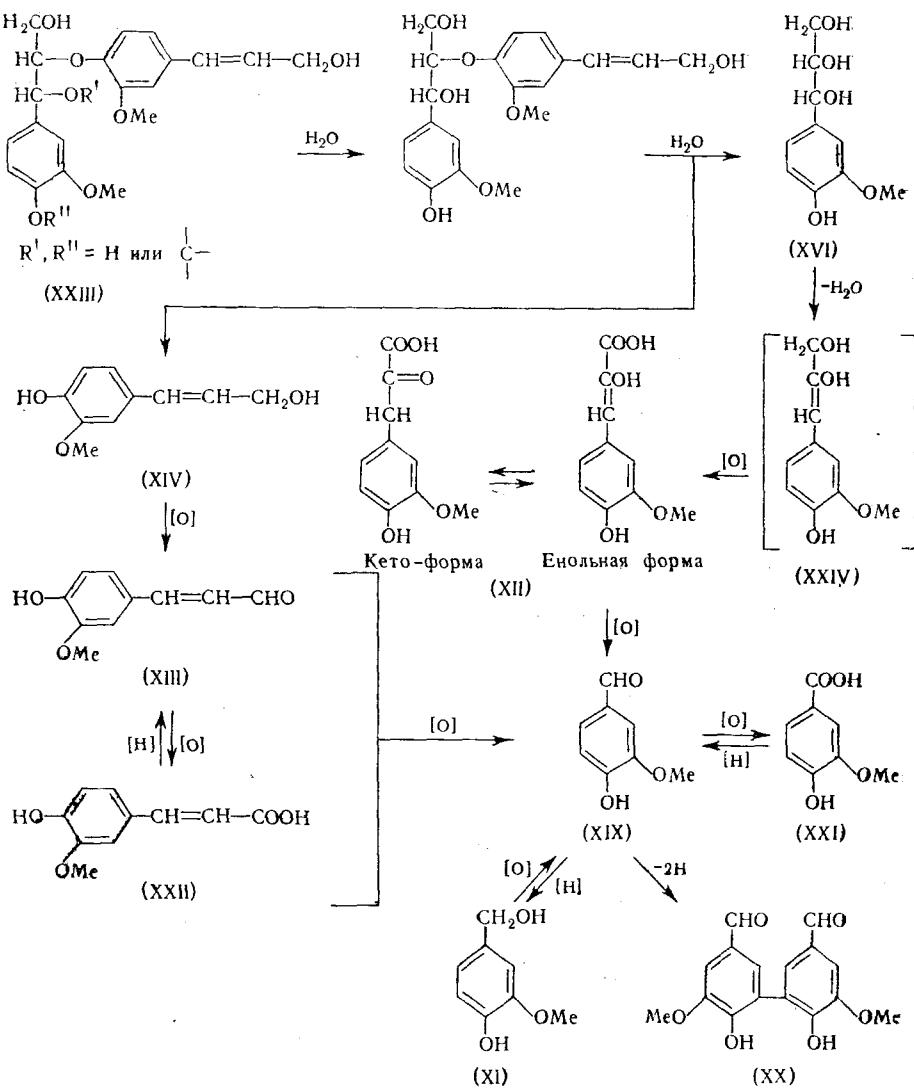
Отмечалось также, что действие обоих грибов приводит к частично-му деметоксилированию ряда метилпроизводных исследованных *p*-окси-фенильных и гвяциловых соединений с последующим окислением деметилированных продуктов. (В ходе последующих исследований¹⁰⁸⁻¹¹¹ отмечалось деметилирование различных метоксилированных ароматических соединений, имевшее место в результате фунгиальной атаки.)

Результаты, полученные в ходе исследования энзиматической деградации лигнина и структурно родственных ему фенольных соединений позволили Ишикаве, Шуберту и Норду предположить, что начальная стадия фунгиальной атаки приводит к потере метоксильных групп и расщеплению некоторых типов эфирной связи, а также деструкции ванилинов образующих структур лигнина. Образовавшиеся в результате низкомолекулярные продукты деградируют далее до ванилиновой кислоты, которая может затем метаболизироваться путем образования протокатеховой кислоты.

Гвяцилглицерин- β -арилэфирные звенья (XXIII) лигнина деградируют через гвяцилглицерин (XVI), β -оксиконифериловый спирт (XXIV) и 4-окси-3-метоксифенилпирваниноградную кислоту (XII). Енольная форма этой кислоты, наиболее чувствительная к действию оксидаз, превращается далее в ванилин, ванилиновую и щавелевую кислоты в результате окислительного расщепления ее боковой пропановой цепи. Конифе-

риловый альдегид и феруловая кислота, также образующиеся при разрушении грибами лигнинов хвойной древесины, аналогичным образом превращаются в ванилин и ванилиновую кислоту (схема 1). Однако

Схема 1



предположение о том, что соединения фенилпропановой структуры являются промежуточными продуктами при деградации лигнина грибами белой гнили и значительная часть полимерного лигнина разрушается, как это показано на схеме 1, основывается, по сути дела, лишь на обнаружении небольших количеств мономерных фенилпропановых соединений, образующихся при инкубации изолированного лигнина с грибами белой гнили (см. раздел IV). Между тем небольшие количества этих продуктов могли образоваться из «боковых групп» или второстепенных структурных элементов, а не из блока фенилпропановых звеньев самого полимера. Кроме того, несмотря на количественную важность арилглицерин-β-арилэфирных связей в лигнине, имеющиеся данные свидетель-

ствуют о том, что их расщепление может освободить только небольшое количество мономерных ароматических соединений, даже если имеет место значительная деполимеризация. (Например, при ацидолизе лигнина, который приводит к количественному расщеплению β -алкиларильных эфирных связей, выход мономерных продуктов деструкции составляет $\sim 11\%$ от лигнина¹¹².) Таким образом, можно заключить, что расщепление арилглициерин- β -арилэфирных связей грибами белой гнили, очевидно, не может привести к освобождению значительных количеств мономерных продуктов.

Ишикава и соавт.¹¹³ исследовали также энзиматическую деградацию гвяцилглициерина (XVI), β -оксикониферилового спирта (XXIV) и 4-окси-3-метоксифенилпироноградной кислоты (XII) очищенными ферментными препаратами, полученными из комков мицелия и освобожденных от мицелия культуральных фильтратов *Fomes fomentarius* и *Collybia velutipes*. Эти препараты включали главным образом тирозиназу, фермент типа лакказы и пероксидазу. Авторы наблюдали энзиматическое превращение соединений (XVI), (XXIV) и (XII) до ванилиновой кислоты через ванилин. Кроме того, показано образование (XII) из (XVI) и (XXIV) и образование соединений типа (XXIV) из (XVI). Полученные результаты рассматривались авторами как еще одно доказательство того, что гвяцилглициерин, образующийся при энзиматической деградации гвяцилглициерин- β -арилэфирных звеньев лигнина хвойных, превращается далее до ванилиновой и щавелевой кислот через β -оксиконифериловый спирт, 4-окси-3-метоксифенилпироноградную кислоту и ванилин путем окислительного расщепления пропановой боковой цепи.

Ишикава и Оки⁶⁸ исследовали деградацию ряда ароматических соединений очищенными препаратами пероксидазы, полученными из хрена, редиски и комков мицелия *Collybia velutipes* N8. Энзиматические превращения исследованных соединений под действием пероксидазы включали как дегидрополимеризацию, так и окислительное расщепление боковых цепей. Примером первого процесса является образование полимеров из ванилина, ацетованилона, гвяцилметилкарбинола, эвгенола, изоэвгенола, феруловой кислоты, кониферилового альдегида, гвяцилглициерина, кониферилового спирта, кислоты Эрдтмана, дегидродиизоэвгенола, пинорезинола, симплокосигенола и гвяцилглициерин- β -гвяцилового эфира, в то время как образование ванилина и дегидродиванилина из ванилилового спирта, ванилилэтилового эфира, β -оксикониферилового спирта и 4-окси-3-метоксифенилпироноградной кислоты является примером второго процесса. (Следует отметить, что метиловые производные всех этих соединений количественно регенерировались из пероксидазных растворов после 2-часовой инкубации.) Авторы показали, что процесс деградации ускоряется добавлением H_2O_2 и увеличением концентрации фермента и ингибируется нагреванием (оптимальный pH 5,3—5,5).

Ишикава и Оки⁶⁹ подвергли ряд ароматических эфирных соединений (гвяцилглициерин- β -гвяциловый эфир, ванилилэтиловый эфир и вератрилметиловый эфир) действию очищенных ферментных растворов, полученных из комков мицелия или свободных от мицелия культуральных фильтратов *Collybia velutipes* N8 и *Polyporus versicolor*. Установлено, что эти соединения претерпевают гидролиз эфирных связей, давая соответствующие спирты. В частности, после инкубации соединения (VIII) с 30-дневным культуральным фильтратом *C. velutipes* (25°, 2-е суток) 20—30% субстрата превращалось в гвяцилглициерин. На основании исследования действия ингибиторов и pH на энзиматический гидролиз ванилилэтилового эфира до ванилилового спирта авторы пришли к заклю-

чению, что фермент, ответственный за гидролиз ароматических эфирных соединений, не относится к металлоксодержащим ферментам типа лакказы и пероксидазы.

Фукузуми и Шибамото⁴⁹ исследовали деградацию вератрилглицерин- β -гвяцилового эфира частично очищенным ферментом из *Poria subacida*. Реакцию проводили при pH 4,0 в уксуснокислотном буферном растворе при 30° в течение 2-х суток. Хроматографическое исследование реакционной смеси показало наличие в ней гвяколя и неидентифицированного соединения, которое, по мнению авторов, является вератрилглицерином или 3-окси-1-(3,4-диметоксифенил)-2-пропаноном.

В ходе последующих экспериментов Фукузуми и сотр.⁵⁰ показали, что количество гвяколя, освобождающегося при действии на соединение (X) частично очищенного фермента из мицелия *P. subacida*, существенно увеличивается при проведении реакции в присутствии восстановливающего кофермента НАД·Н₂ (восстановленный никотинаденидинуклеотид). Авторы сообщили также об образовании гвяцилглицерина (XVI) при инкубации соединения (X) с ферментом из *P. subacida* в присутствии НАД·Н₂. Последнее свидетельствует о том, что помимо энзиматического расщепления β -алкиларильной эфирной связи имеет место пара-деметилирование. Однако идентификация соединения (XVI) основывалась исключительно на данных ТСХ с одной системой растворителей и потому не может считаться адекватной. Фукузуми и сотр.⁵⁰ сообщили, что использованная в данных экспериментах ферментная система не атакует β -алкиларильную эфирную связь в соединениях, содержащих α -кетогруппу, в то время как β -эфирная связь в этиленгликоловых и глицериновых структурах расщепляется. Очевидно, наличие бензильной гидроксильной группы в боковой цепи является фактором, определяющим возможность расщепления β -эфирной связи ферментной системой из *P. subacida*.

Авторы высказали предположение, что расщепление β -алкиларильной эфирной связи может протекать по двум возможным механизмам. Один из них — непосредственное гидроксилирование β -углеродного атома в присутствии НАД·Н₂ и кислорода. Эта реакция должна приводить к образованию гвяколя и вератрил- или гвяцилдиоксицетона (последний не был идентифицирован авторами, которые полагают, что он может восстанавливаться до гвяцилглицерина). Второй — гидролитическая реакция гвяцилглицерин- β -гвяцилового эфира, который образуется путем деметилирования исходного субстрата и является более гидролизуемым по сравнению с вератрилглицерин- β -гвяциловым эфиром. Низкий выход гвяколя при энзиматическом расщеплении соединения (X) в присутствии НАД·Н₂ (максимально 30%), по мнению Фукузуми и сотр., обусловлен стереоспецифичностью фермента по отношению к *эритро*- и *трео*-формам вератрилглицерин- β -гвяцилового эфира.

Таким образом, результаты рассмотренных исследований указывают на возможность существования ферментной системы, которая расщепляет арилглицерин- β -арилэфирные связи в лигнине. Однако отмеченные выше методические недостатки проведенных экспериментов не позволяют достаточно строго охарактеризовать эту ферментную систему и механизм ее воздействия на лигнин.

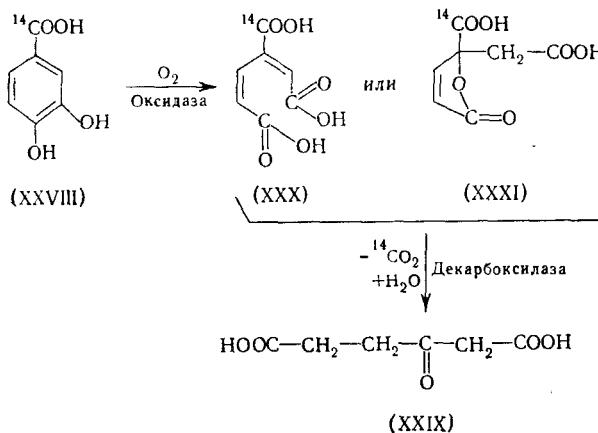
Проведенные исследования свидетельствуют о способности грибов белой гнили превращать гвяцилглицерин- β -арилэфирные или, возможно, другие структурные элементы лигнина в мономерные бензоидные соединения типа ванилина и ванилиновой кислоты. Дальнейшее использование этих соединений грибами белой гнили может, очевидно, протекать различными путями, важной стадией которых является расщепление ароматического кольца. Опубликованы данные, свидетельствующие

о том, что в результате фунгиального воздействия происходит процесс расщепления ароматических ядер. Так, Фукузуми и сотр. сообщили, что в результате инкубации бензойной кислоты с комками мицелия гриба *Polystictus sanguineus* образуются ацетоуксусная (XXV) ⁹⁷ и α -кетоглутаровая ¹¹⁴ кислоты, отсутствовавшие в контролльном опыте. Позднее Фукузуми ¹¹⁵ наблюдал, что *Poria subacida* полностью метаболизировала гентизиновую кислоту (XXVI) до углекислого газа. Крауден ¹¹⁶ установил, что *Polyporus tumulosus* полностью метаболизировал p -оксифенилпироноградную, p -оксифенилуксусную, p -оксиминдальную, p -оксибензойную и протокатеховую кислоты и более чем на 50% гомогентизиновую (XXVII), 2,5-диоксиминдальную и гентизиновую (XXVI) кислоты.

Мур и Тауэрс ^{117, 118} исследовали деградацию фенилаланина и тирозина дереворазрушающими грибами *Schizophyllum commune*, *Sporobolomyces roseus* и *Ustilago hordei*. Инкубация мицелиальных пленок *S. commune* или промытых клеточных суспензий *S. roseus* с меченым в кольце фенилаланином приводила к образованию $^{14}\text{CO}_2$. Все три организма превращали меченный фенилаланин в коричную, бензойную, p -оксибензойную и протокатеховую кислоты, кроме того, в продуктах метаболизма *S. commune* обнаружены фенилмолочная и фенилуксусная кислоты. Из трех исследованных грибов только *S. roseus* обладала тиразной активностью, превращая тирозин и p -кумаровую кислоту в p -оксибензойную и протокатеховую кислоты. На основании полученных результатов авторы предложили следующую последовательность энзиматической деградации фенилаланина и тирозина: первоначальное деаминирование до соответствующих производных акриловой кислоты, которые претерпевают окисление боковой цепи, в результате чего образуются соответствующие C_6 — C_1 -кислоты. Дальнейшее гидроксилирование приводит к образованию протокатеховой кислоты (XXVIII)—конечного ароматического соединения в этой последовательности, которое затем претерпевает расщепление ароматического кольца. Наличие фенилмолочной и фенилуксусной кислот в продуктах метаболизма *S. commune* свидетельствует о существовании еще одного, помимо рассмотренного выше, пути деградации фенилаланина этим организмом.

Хайдер и Флайер ^{47, 119—121} установили, что в результате воздействия *Polystictus versicolor* или ферментной системы, выделенной из этого гриба, протокатеховая кислота (XXVIII) превращается в β -кетоадипиновую кислоту (XXIX). Согласно представлениям авторов, фунгиальное превращение (XXVIII) \rightarrow (XXIX) (схема 2) протекает по тому же ме-

Схема 2



низму, что и аналогичное превращение под действием бактерий¹²²⁻¹²⁶. Согласно этому механизму, оксидаза протокатеховой кислоты катализирует первоначальное превращение протокатеховой кислоты в *цис*, *цис*- β -карбоксимуконовую кислоту (XXX), которая под действием специфического лактонизирующего фермента может превращаться рядом бактерий в лактон β -карбоксимуконовой кислоты (XXXI). И кислота (XXX), и ее лактон (XXXI) превращаются затем в β -кетоадипиновую кислоту (XXIX) в результате действия двух различных энзиматических систем, обозначаемых обычно как декарбоксилаза.

Таким образом, данные, полученные в ходе рассмотренных выше экспериментов, свидетельствуют о том, что разрыв ароматического кольца происходит в том случае, когда соединение либо содержит, либо может превратиться в орто- или пара-диоксиленольное производное. При микробиологической деградации о-диоксиленолов расщепление может протекать по двум различным механизмам. Ароматическое кольцо может разрываться либо между гидроксильными группами, либо непосредственно рядом с гидроксильной группой. *p*-Диоксиленолы претерпевают разрыв кольца между углеродным атомом, связанным с OH-группой, и соседним, содержащим заместитель углеродным атомом^{127, 128}.

Хайдер и Граббе¹²⁹ исследовали деградацию меченного ¹⁴C биосинтетического лигнина грибами белой гнили и пришли к заключению, что этот процесс, по-видимому, не протекает через первоначальное расщепление C—C- или C—O-связей боковых цепей, а включает разрушение ароматических колец, еще связанных в полимере. Этот вывод, однако, пока не получил дополнительного экспериментального подтверждения.

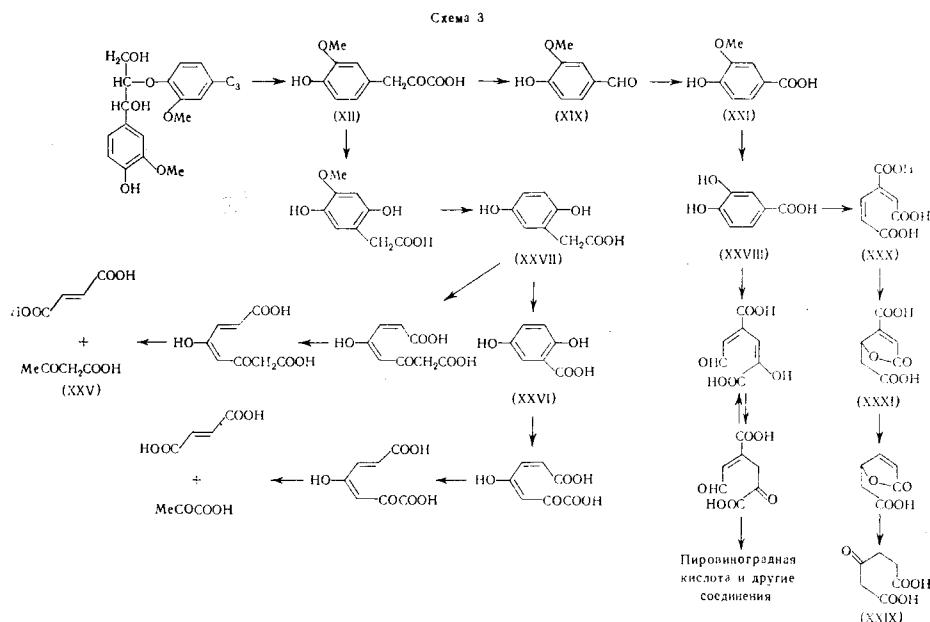
Хайдер⁴⁸, суммируя исследования по микробиологической деструкции лигнина, пришел к выводу, что деградация лигнина дереворазрушающими грибами включает следующие реакции, протекающие без участия фенолоксидаз: 1) укорочение боковой цепи, приводящее к образованию фенольных альдегидов, которые далее могут окисляться до соответствующих кислот или восстанавливаться до соответствующих спиртов; 2) расщепление метилэфирных связей и элиминирование метоксильных групп; 3) расщепление ароматических колец.

Одновременно в результате действия фенолоксидаз продукты распада лигнина претерпевают окисление с образованием окрашенных полимеризатов. Первой стадией этого процесса является дегидрирование, приводящее к образованию реакционноспособных радикалов и хинонов.

На основании результатов рассмотренных выше исследований Христман и Оглесби¹² предложили схему деградации гвяцилглицерин- β -арилэфирного звена лигнина хвойных древесных пород в результате действия грибов белой гнили (схема 3).

Кирк, Харкин и Каулинг¹³⁰ исследовали действие двух грибов белой гнили *Polyporus versicolor* и *Stereum frustulatum* на модельные соединения лигнина: гвяцилглицерин- β -гвяциловый эфир (VIII) и вератрилглицерин- β -гвяциловый эфир (X). Из двух испытанных грибов белой гнили один (*P. versicolor*) является типичным, а второй (*S. frustulatum*) — нетипичным. По мнению авторов¹³⁰, эти грибы представляют собой крайние разновидности грибов белой гнили в отношении образования фенолокисляющих ферментов.

В результате проведенного исследования установлено, что в синтетической жидкой среде под действием обоих грибов гвяциловая модель (VIII) превращается в ряд продуктов, преобладающим среди которых является *o,o'*-диоксибифенильный дегидродимер (XXXII). Это бифенильное производное также было основным продуктом, когда соединение (VIII) инкубировали с лакказой. Вератровая модель (X) не изменя-

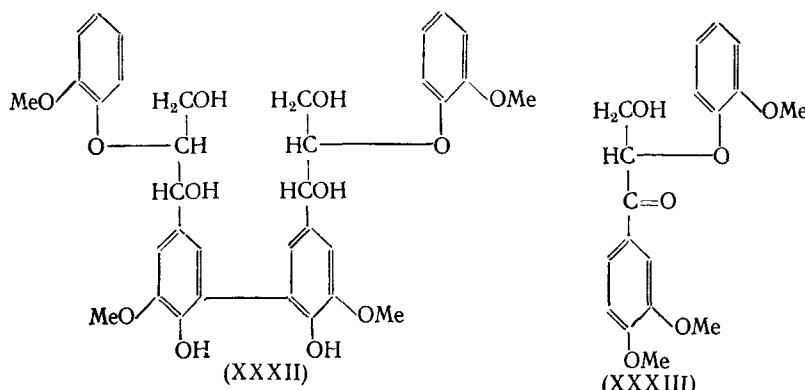


лась ни обоими испытанными грибами в синтетической водной среде, ни очищенной лакказой. Однако в среде, содержащей древесную муку, соединение (X) окислялось обоими грибами до α -гвайакоси- β -оксипропиовератрона (XXXIII). Специальные эксперименты по выяснению роли древесной муки в процессе этого окисления показали, что лигнин в древесине является субстратом для образования радикалов при действии фенолоксидаз, продуцируемых обоими грибами.

Таким образом, то обстоятельство, что гвайцилглицерин- β -гвайциловый эфир воспринимчив к действию испытанных грибов белой гнили, в то время как вератрилглицерин- β -гвайциловый эфир в тех же условиях не изменяется, очевидно, свидетельствует о том, что фенольная OH-группа, а не β -эфирная связь непосредственно затрагиваются в данных культуральных условиях. В пользу этого заключения говорит и тот факт, что D,L -глицерин- β -гвайциловый эфир в синтетической жидкой среде не изменяется обоими испытанными грибами. Наблюдавшаяся димеризация гвайциловой модели до бифенильного дегидродимера под действием обоих грибов белой гнили и превращение вератрилглицерин- β -гвайцилового эфира в соответствующий вератрон в присутствии древесины представляют собой окислительные реакции и, по мнению авторов, являются результатом действия фенолоксидаз.

Кирк, Харкин и Каулинг⁹⁴ продолжили исследование действия грибов *P. versicolor* и *S. frustulatum*, используя в качестве субстрата сирингилгликоль-β-гвяциловый эфир (XXXIV). Сирингильная, а не гвяциловая модель была выбрана с целью избежать катализируемых фенолоксидазой реакций конденсации, включающих орто-положение по отношению к фенольной OH-группе.

В результате проведенного исследования установлено, что соединение (XXXIV) окислялось культуральными фильтратами *P. versicolor* или цельными культурами *S. frustulatum* до α -гвайакосиацетосирингона (XXXV). Культуральные фильтраты *P. versicolor* расщепляли алкилфенильную С—С-связь в соединениях (XXXIV) и (XXXV) с образованием гвайакосиацетальдегида (XXXVI) и гвайакосикускусной кислоты

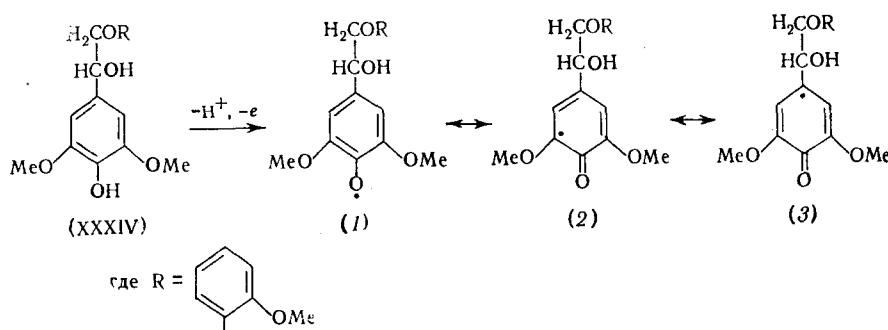


(XXXVII) соответственно. Сиригильные половины обоих исходных соединений превращались в 2,6-диметокси-*p*-бензохинон (XXXVIII) культуральными фильтратами *P. versicolor* и цельными культурами *S. frustulatum*. Кроме того, показано, что лакказа, выделенная из культуральных фильтратов *P. versicolor*, катализировала все вышеперечисленные реакции.

Одновременно установлено, что цельные культуры *P. versicolor* и *S. frustulatum* восстанавливали гвяякоксиацетальдегид и гвяякоксиуксусную кислоту до 2-гвяякоксиэтанола, который накапливался в реакционной смеси и был устойчив к дальнейшим изменениям любым из этих организмов. Поскольку 2-гвяякоксиэтанол образовывался при воздействии цельных культур обоих грибов на сиригилгликоль- β -гвяяциловый эфир и α -гвяякоксиацетосирингон, очевидно, что упомянутое выше алкилфенольное расщепление может осуществляться цельными культурами.

Авторы предложили механизмы основных реакций, протекающих при энзиматической деградации модельного соединения (XXXIV).

Окисление сиригилгликоль- β -гвяяцилового эфира (XXXIV), катализируемое фенолоксидазой грибов, приводит к образованию свободного радикала, который может существовать по крайней мере в трех основных резонансных формах. Они аналогичны мезомерным формам R_a , R_c и R_d кониферилспиртового радикала, образующегося, согласно теории Фрёйденберга¹³¹, во время биосинтеза лигнина.

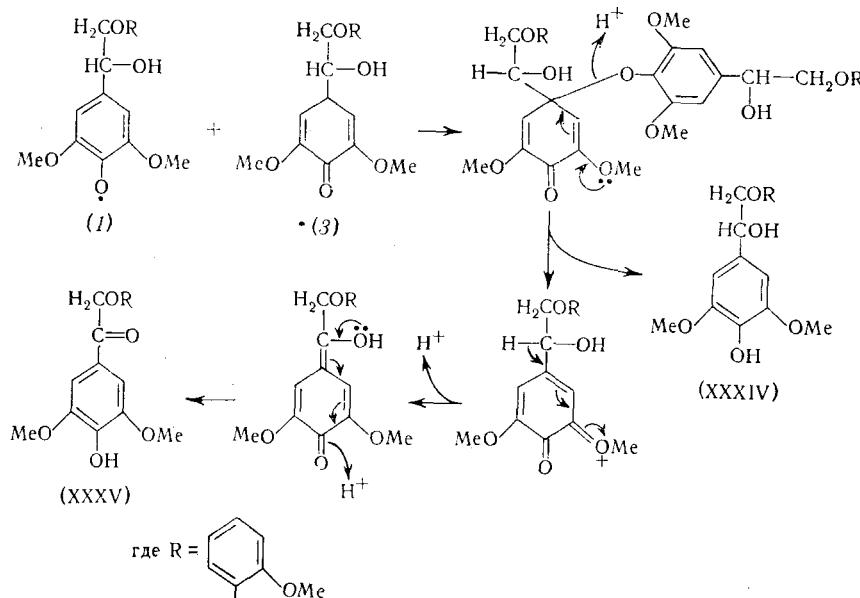


Мезомерные формы образовавшегося радикала могут либо претерпевать реакции диспропорционирования, либо комбинироваться, образуя димерные продукты, которые далее могут изменяться реакциями стабилизации. Образование бифенильных соединений посредством орто—ортосочетания (включая радикальную форму 2), наблюдаемое с гвяяциловыми соединениями^{94, 132, 133}, в значительной степени лимитируется ме-

токсильными группами в сиригильных соединениях, т. е. доля радикала в форме (2) в последующих реакциях незначительна^{134, 135}.

Механизм окисления сиригилгликоль- β -гваяцилового эфира, являющегося по существу реакцией диспропорционирования, представлен на схеме 4.

Схема 4



Начальной стадией рассматриваемого процесса является спаривание феноксильной (1) и метиленхиноидной (3) радикальных форм. Распределение электронной пары метоксильного кислородного атома на циклогексадиеноновое кольцо приводит к элиминированию молекулы сиригилгликоль- β -гваяцилового эфира (XXXIV). Последующая стабилизация образовавшейся молекулы достигается потерей протона от бензильного С-атома. Повторная ароматизация приводит к образованию α -гваякоксиацетосирингона (XXXV).

На схеме 5 приведен механизм образования гваякоксиацетальдегида (XXXVI) из сиригилгликоль- β -гваяцилового эфира.

За начальным сочетанием радикалов в мезомерных формах (1) и (3) следует элиминирование протона от бензильной OH-группы на *p*-метиленхиноидную половину. Последующее расщепление бензильно-кольцевой C-C-связи вызывает освобождение боковой цепи в виде альдегида и повторную ароматизацию исходной молекулы.

Возможно также сочетание двух радикалов в мезомерной форме (3). Образующийся дегидродимер в результате элиминирования обоих боковых цепей дает 3,3',5,5'-тетраметокси-*p*-бифенол, превращающийся при продолжении окисления в церулигнен. Последний в незначительных количествах обнаружен Кирком и соавт.⁹⁴ в продуктах окисления модельного соединения (XXXIV) лакказой из *P. versicolor*. Однако эта реакция, по-видимому, ограничена стерическими препятствиями.

Аналогичный механизм (см. схему 6) предложен для объяснения образования гваякоксикусной кислоты (XXXVII) из α -гваякоксиацетосирингона (XXXV).

Схема 5

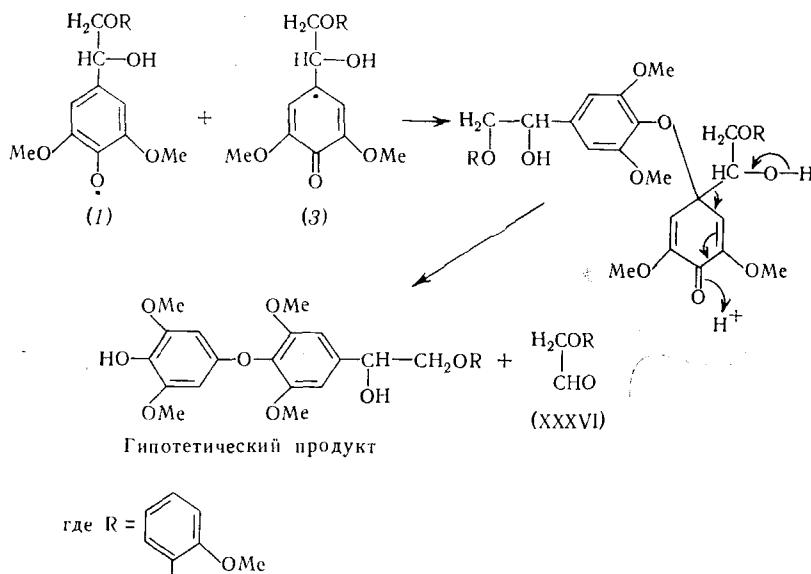
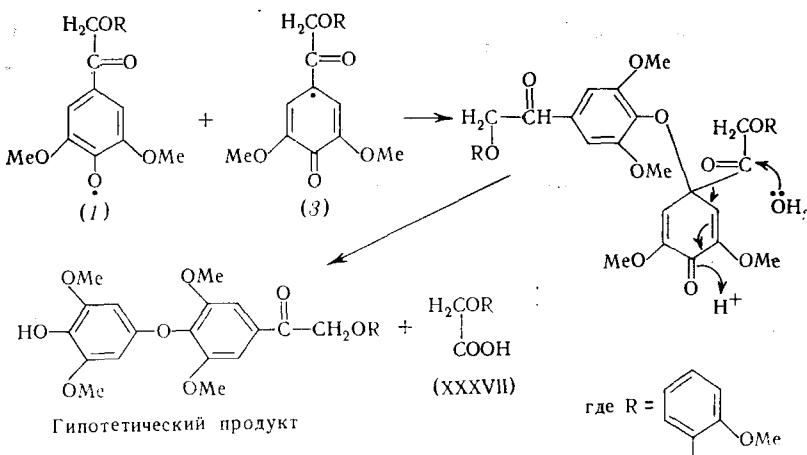


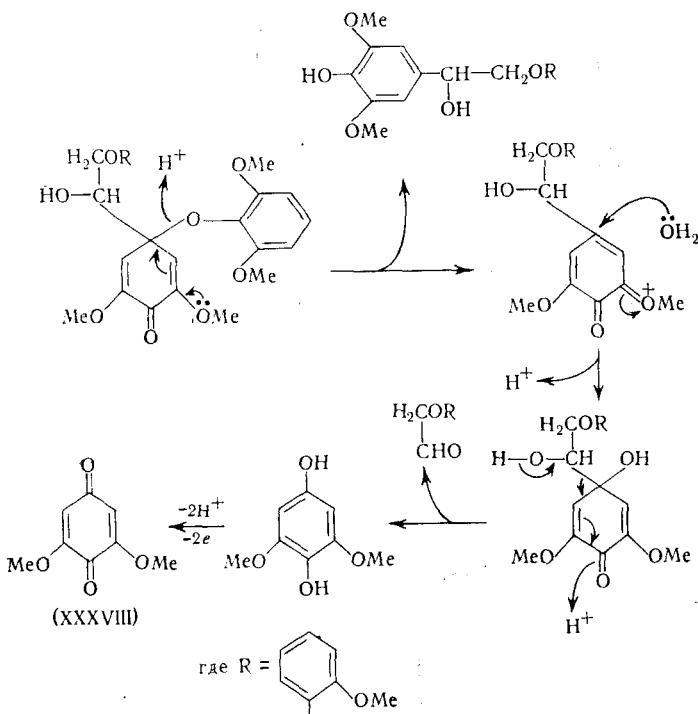
Схема 6



После сочетания феноксильной (1) и *p*-метиленхиноидной (3) форм радикала, образованных в результате окисления фенола, нуклеофильная атака молекулы воды на карбонильный заместитель в циклогексадиеноновом кольце вызывает его перемещение, давая гвяякоксикусную кислоту (XXXVII) и дифениловый эфир. Возможная комбинация двух *p*-метиленхиноидных радикалов формы (3) с последующим элиминированием обоих боковых цепей приводит к образованию 3,3'5,5'-тетраметокси-*p*-бифенола, который затем будет окисляться до церулигнона. Последний с незначительным выходом получен при окислении соединения (XXXV) лаказой из *P. versicolor*.

Образование 2,6-диметокси-*p*-бензохинона (XXXVIII) в результате окислительного расщепления сирингилгликоль- β -гвяяцилового эфира представлено на схеме 7.

Схема 7



Начальной стадией этого процесса также является комбинация феноксильной и *p*-метиленхиноидной форм радикала, приводящая к нестабильному циклогексадиеноновому производному (эта стадия на схеме 7 не представлена). Распределение электронной пары одного из метоксильных кислородных атомов на циклогексадиеноновое кольцо приводит к элиминированию молекулы сирингилгликоль- β -гваяцилового эфира. Далее имеет место нуклеофильная атака водой на положение 4 циклогексадиенонового кольца с последующей потерей протона. Элиминирование гваялоксиацетальдегида с повторной ароматизацией диеноновой половины дает 2,6-диметоксигидрохинон, который энзиматически окисляется до соответствующего *p*-хинона. Аналогичный механизм может объяснить образование хинона из двух молекул α -гваялоксиацетосирингона.

Основываясь на результатах проведенных исследований, Кирк, Харкин и Каулинг предложили так называемую «фенолоксидазную» гипотезу, объясняющую механизм деполимеризации лигнина при действии грибов белой гнили. Согласно этой гипотезе, фенолокисляющие ферменты, которые присутствуют в гифах грибов белой гнили, и, по-видимому, освобождаются из них, когда последние проникают через древесную ткань, катализируют окисление фенольных OH-групп в макромолекуле лигнина. Образующиеся нестабильные свободные радикалы затем стабилизируются реакциями, которые конденсируют некоторые лигнинные структуры, но одновременно приводят к расщеплению углерод-углеродных связей между боковыми цепями и кольцами других окисленных фенилпропаноидных звеньев. Последующее удаление конечной алифатической части раскрывает дополнительные фенольные OH-группы для продолжающегося деградирующего энзиматического окисления. Суммарный эф-

фект таких процессов теоретически привел бы к фрагментации некоторых частей макромолекулы лигнина и к конденсации остатка.

Интересно отметить, что реакции алкилфенильного расщепления, которые лежат в основе предложенной гипотезы, были впервые обнаружены в ходе детальных исследований процесса биосинтеза лигнина. В частности Фрёйденберг и сотр.¹³⁶ показали, что при энзиматической дегидрогенизации синапового спирта его конденсация останавливается на димере сирингарезиноле, причем продолжающееся энзиматическое воздействие приводило к разрушению этого димера. Обнаружение среди продуктов деградации 2,6-диметокси-*p*-бензохинона свидетельствует о том, что имел место окислительный разрыв алкиларильных углерод-углеродных связей. Кроме того, авторы сообщили о том, что при продолжительном окислении лигнина очищенной лакказой наблюдается образование 2-метокси-*p*-бензохинона.

Сравнительно недавно в лигнине был обнаружен новый важный тип структурных элементов — 1,2-диарилпропан-1,3-диольные структуры¹³⁷⁻¹³⁹. Механизм их образования в процессе энзиматической дегидрогенизации *p*-оксикоричных спиртов, предложенный Лундквистом и Микше¹³⁷, включает алкилфенильное расщепление. Позднее этот механизм получил дополнительные экспериментальные подтверждения^{138, 140}. И наконец, в ходе исследования продуктов энзиматического дегидрирования пропиогвайакона Пью и Коннорс¹⁴¹ идентифицировали трифенильное производное, образование которого, по всей вероятности, включает расщепление алкилфенильной связи.

Основываясь на схематической формуле фрагмента молекулы лигнина, предложенной Фрёйденбергом^{131, 142}, Кирк и соавт.⁹⁴ подсчитали, что 41% фенилпропановых звеньев лигнина чувствительны к описанным выше типам расщепления.

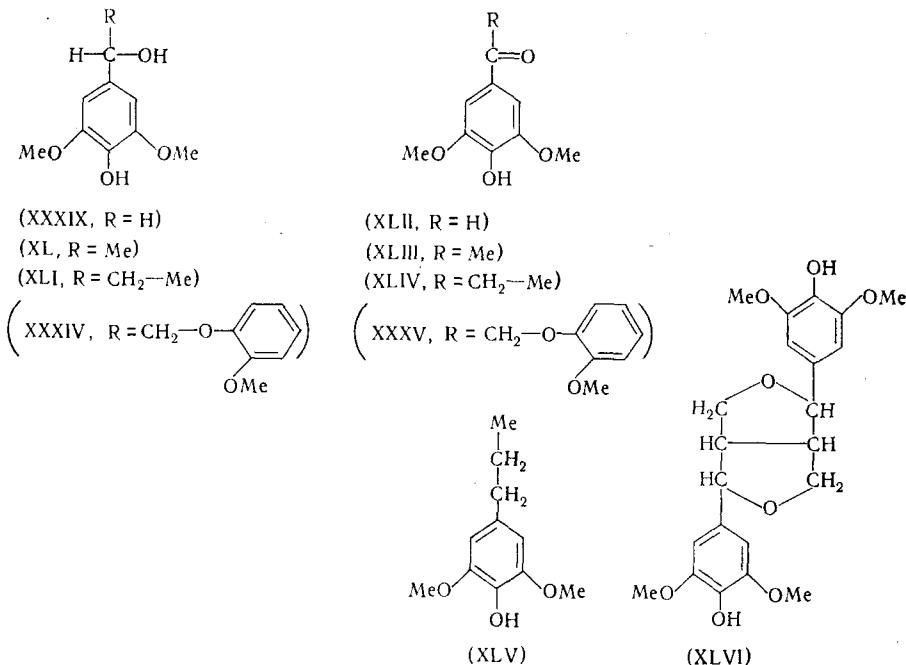
С целью выяснить роль пероксидазы и лакказы в деградации лигнина Гирер и Опара¹⁴³ исследовали действие этих ферментов на мономерные (гвяжол, 2,6-диметоксиленол, глицерилариловые эфиры) и димерные (1-гвяжол-2-сирингилэтанол, пинорезинол и дигидродегидродизоэвгенол) фенольные соединения, структурно родственные лигнину. Ферментативное воздействие приводило к образованию продуктов более высокого молекулярного веса в результате углерод-углеродного и углерод-кислородного сочетания. Нефенольные модельные соединения не затрагивались обоими ферментными системами. Это свидетельствует о том, что их катализитический эффект по своей природе окислительный, а не гидролитический.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что обе ферментные системы функционируют главным образом, если не исключительно, катализируя окислительное сочетание с образованием ариларильных или арил- O -арильных связей. Не получено доказательств расщепления эфирных связей — продукты сочетания содержали все первоначально присутствовавшие арилалкильные связи, в том числе метил-арилэфирные и β -алкиларилэфирные связи. Таким образом, деградирующий эффект исследованных ферментов должен быть связан с реакциями окислительного сочетания, которые они катализируют. Выше были рассмотрены дегидрогенизационные реакции этого типа, вызываемые лакказой⁹⁴ или пероксидазой^{144, 145} на модельных соединениях *p*-окси- α -карбонильного^{94, 144} и *p*-окси- α -карбонильного^{94, 145} типов.

Идентичный состав продуктов сочетания, полученных с пероксидазой — H_2O_2 и с лакказой, а также отсутствие специфичности к субстрату у обоих ферментов свидетельствуют о том, что только первая стадия в этих реакциях — отделение водорода от фенольной гидроксильной

группы — энзиматически катализируется. Последующие сочетания, очевидно, протекают самопроизвольно. Авторы указывают на то, что в ходе проведенного исследования не получено никаких экспериментальных доказательств непосредственного участия обоих ферментов в микробиологической деградации лигнина. Однако это не исключает возможности того, что реакции окислительного сочетания могут составлять первую ступень реакционной последовательности, в которой пероксидаза и лакказа в сочетании с другими, еще неизвестными ферментами принимают участие в микробиологическом расщеплении лигнина.

Как отмечалось выше, Кирк и соавт., исследуя энзиматическую деградацию ряда модельных соединений лигнина, предположили существование свободнорадикальных промежуточных соединений, которые могли возникать путем потери одного электрона от соответствующих фенолов. Кроме того, отмечалось, что подвергшаяся гниению древесина, по данным спектрометрии ЭПР, характеризуется более высокой концентрацией свободных радикалов⁷⁵⁻⁷⁷. С целью установить, какие структуры лигнина образуют наиболее стабильные типы свободных радикалов при энзиматической деградации, Кольдвелл и Стилинк⁷⁹ подвергли ряд сирингилпроизводных, в том числе бензиловые спирты (XXXIX—XL, XXXIV), α -карбонильные соединения (XLII—XLIV, XXXV), а также сирингилпропан (XLV) и сирингарезинол (XLVI) окислению H_2O_2 в присутствии пероксидазы хрена и установили, что все эти соединения образуют стабильные промежуточные феноксильные радикалы.

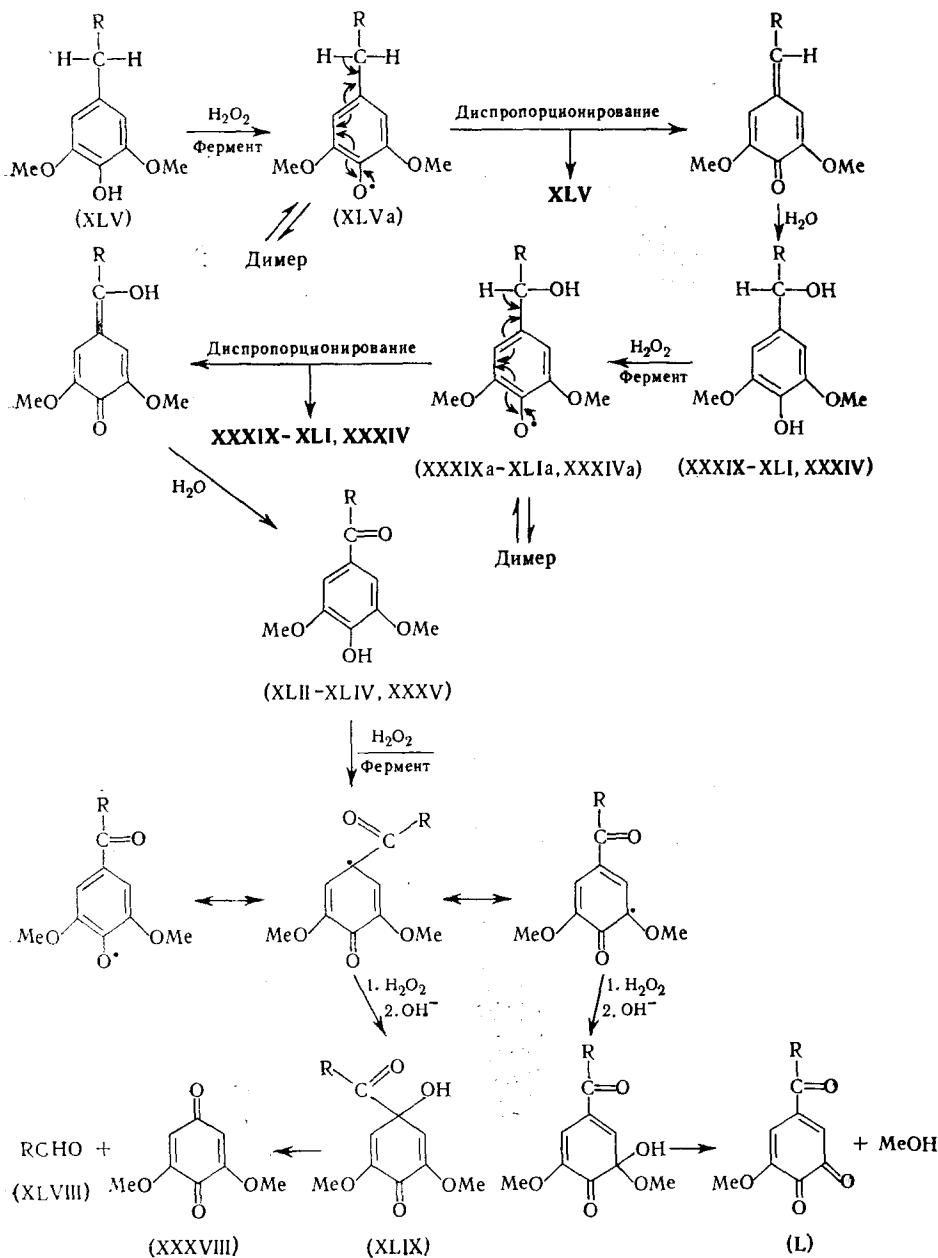


Результаты проведенных исследований показали, что феноксильные радикалы наиболее легко образуются из α -карбонильных сиригил производных, менее легко из α -карбиноильных и α -алкилэфирных и медленно из алкильных.

Для установления последовательности реакций, протекающих при окислении испытанных соединений, реакционную смесь одновременно контролировали методами ЭПР-спектроскопии и оптической спектро-

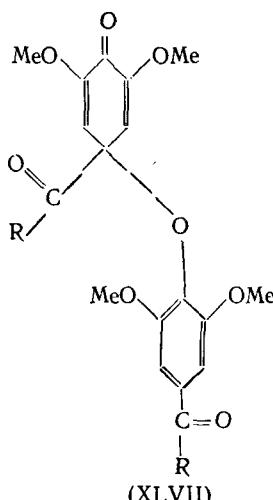
скопий. Кроме того, аликовты реакционной смеси периодически подвергали хроматографическому разделению в тонком слое для идентификации продуктов реакции. На основании полученных данных предложен механизм энзиматического окисления исследованных соединений, приведенный на схеме 8.

Схема 8



Система пероксидаза — H_2O_2 , по-видимому, удаляет фенольный водородный атом от субстрата. Образующийся в результате феноксильный

радикал, который находится в равновесии с гидрохинон-эфирным димером (XLVII), затем диспропорционирует, давая фенол более высокого окислительного потенциала. Этот второй фенол не претерпевает дальнейшего окисления, пока не будет использован весь исходный субстрат. Указанный процесс повторяется до тех пор, пока не произойдет отщепления боковой цепи.



Таким образом, энзиматическое окисление протекает путем последовательности раздельных стадий. Отделение водородного атома, по-видимому, определяет скорость реакции при каждом изменении окислительного состояния субстрата. Диспропорционирование двух радикальных форм (или димерной формы) протекает быстро.

Следует отметить, что ранее Пью¹³² сообщил о том, что H_2O_2 и пероксидаза способны гидроксилировать α -положение сиригиллпропана. Колдвелл и Стилинк показали, что это превращение также является одноэлектронным переносом. Особенный интерес представляла исследованная авторами реакция пероксидазы и H_2O_2 с соединением (XXXIV). Окисление этого соединения лакказой было подробно исследовано Кирком и соавт.¹³⁰, которые показали, что основным продуктом реакции является соединение (XXXV), в дополнение к которому образуется некоторое количество (XXXVI), (XXXVIII) и неидентифицированных продуктов. Высокий выход соединения (XXXV), по-видимому, обусловлен его нерастворимостью в воде, что препятствовало дальнейшему окислению. Поскольку Колдвелл и Стилинк проводили окисление соединения (XXXIV) в водно-метанольной среде, в которой растворялось соединение (XXXV), они получили высокий выход феноксильного радикала из (XXXV) и соединения (XXXVIII).

Согласно схеме 8, хинон (XXXVIII) и альдегид (XLVIII) образуются на последней стадии окисления. Колдвелл и Стилинк высказали предположение о существовании двух возможных способов распада радикалов, образующихся из соединений (XLII—XLIV, XXXV) — через промежуточное соединение (XLIX) или его гипероксидный предшественник, которые могут непосредственно давать соединения (XXXVIII) и (XLVIII), а также через α -хинон (L), который мог быть источником небольшого количества неидентифицированного красного вещества.

Позднее Янг и Стилинк¹⁴⁶ установили, что действие пероксидазы хрина и H_2O_2 на 4-замещенные 2,6-диметоксиленолы, а также ЛМР и ще-

лочные лигнины из древесины лиственных пород приводят к образованию феноксильных радикалов, причем лигнинные субстраты деградируют по тому же окислительному механизму, что и простые фенольные субстраты.

Результаты рассмотренных исследований дают основание предположить, что наиболее чувствительными к фунгиальной атаке на макромолекулу лигнина являются α -карбонильные функции в звеньях со свободным фенольным гидроксилом. Если распад всех звеньев лигнина со свободной фенольной гидроксильной группой происходит по предложенному Колдвеллом и Стилинком свободнорадикальному механизму, то этим можно объяснить значительную деполимеризацию лигнина на основе серии одноэлектронных водородных отщеплений. В то же время необходимо подчеркнуть¹⁴⁷, что основная стадия дегидрогенизации регулируется структурой фенольного субстрата, а также окислительным потенциалом фермента или химического окислителя. В биологических системах возможность протекания такого окисления в большей степени будет зависеть от таких факторов, как наличие соответствующих ферментов, pH среды и наличие окислителей, например, O_2 или H_2O_2 . Комбинация этих факторов определяет предпочтительное протекание и степень полимеризационных или деградационных превращений при действии одной и той же системы фермент—окислитель.

Сергеева и сотр.¹⁴⁸ исследовали действие гриба бурой гнили *Fomitopsis pinicola* I на кониферин, глюкованилин, ванилин, сиреневый альдегид и конифериловый спирт. Сиреневый альдегид и ванилин не претерпевали изменений в результате ферментативного воздействия, в то время как конифериловый спирт окислялся до ванилина. Действие гриба *F. pinicola* I на кониферин и глюкованилин приводило к разрыву β -фенилглюкозидной связи с образованием кониферилового спирта и ванилина, соответственно. Эти первичные продукты распада претерпевали дальнейшее окисление. Так, в продуктах разложения глюкованилина после 10 суток действия гриба наряду с ванилином обнаружены ваниловая кислота и еще две неидентифицированные кислоты. В продуктах разложения кониферина после 10 суток обнаружены конифериловый спирт и конифериловый альдегид, а при более длительном энзиматическом воздействии (45 суток), кроме того, ванилин.

Авторы полагают, что образование кониферилового спирта из кониферина и ванилина из глюкованилина при действии гриба *F. pinicola* I протекает через промежуточную стадию соответствующих нестабильных феноксильных радикалов. Высказано предположение, что в случае воздействия гриба *F. pinicola* I на древесину разрыв β -фенилглюкозидных лигноуглеводных связей может привести к образованию стабильных феноксильных радикалов. Последующее окисление кониферилового спирта до кониферилового альдегида и кониферилового альдегида до ванилина также, очевидно, протекает через свободнорадикальные промежуточные соединения. Наблюдавшееся при глубоком энзиматическом разрушении древесины скачкообразное повышение концентрации парамагнитных центров⁷⁷, по мнению авторов, может быть следствием окисления лигнинных структур и образования стабильных феноксильных радикалов. На основании содержания функциональных групп и данных ИК-спектрального исследования древесины ели и березы на последовательных стадиях их деградации грибом *F. pinicola* I Крейцберг и соавт.^{149, 150} пришли к заключению об увеличении количества хингидронных структур в макромолекуле лигнина, причем биолигнин, выделенный из деструктированной древесины ели, содержал больше этих структур по сравнению с аналогичным препаратом из древесины березы.

Заканчивая рассмотрение возможных направлений микробиологической деградации лигнина, следует сделать несколько общих замечаний.

Как уже отмечалось, имеются указания на наличие в дереворазрушающих грибах ферментной системы, способной расщеплять арилглицерин- β -арилэфирные связи в лигнине. Однако расщепление этих связей, очевидно, не приводит к высвобождению значительных количеств мономерных продуктов, хотя и может вызывать деполимеризацию лигнина.

В связи с этим более обоснованной представляется выдвинутая Кирком так называемая «фенолоксидазная гипотеза», согласно которой фенолоксидазы ферменты дереворазрушающих грибов катализируют окисление фенольных OH-групп макромолекулы лигнина. В результате этого образуются нестабильные свободные радикалы, которые затем стабилизируются в ходе реакций, приводящих к конденсации некоторых лигнинных структур и одновременному расщеплению углерод-углеродных связей между боковыми цепями и кольцами других окисленных фенилпропановых звеньев. По мнению Кольдвелла и Стилинка, деструкция лигнина происходит в результате серии одноэлектронных переносов, приводящей в конечном итоге к отщеплению боковой цепи.

Следует иметь в виду, что вследствие разнообразия связей между мономерными звеньями в лигнине¹⁵¹ полное разрушение может не включать прямую атаку на каждую из этих связей с результирующим высвобождением низкомолекулярных фенольных соединений. Скорее может иметь место прямая атака на общие структурные элементы полимера, такие как ароматические ядра, а разрыв связей между фенилпропановыми звеньями может протекать косвенным путем. Однако имеющиеся данные недостаточны для того, чтобы сделать определенные выводы.

Таким образом, рассмотренные в настоящем обзоре работы, к сожалению, не позволяют сделать однозначного вывода ни о ферментных системах, присутствующих в дереворазрушающих грибах, ни о механизме микробиологической деградации лигнина, хотя очевидно, что решение этих проблем необходимо для успешной работы в тех направлениях, о которых шла речь во введении.

ЛИТЕРАТУРА

1. L. R. Lawson, мл., C. N. Still, Tappi, 40, № 9, 56A (1957).
2. W. B. Cooke, Там же, 40, 301 (1957).
3. H. Lyr, Arch. Forstwesen, 10, 615 (1961).
4. Ф. Э. Браунс, Д. А. Браунс, Химия лигнина, «Лесная пром-сть», М., 1964, гл. 22.
5. I. A. Pearl, The chemistry of lignin, N. Y., Marcel Dekker, Inc., 1967, ch. 8.
6. R. Sopko, Holz Roh-Werkstoff, 26, 222 (1968).
7. В. Д. Шуберт, Биохимия лигнина, «Лесная пром-сть», М., 1968, гл. 4.
8. W. J. Schubert, Compr. Biochem., 20, 193 (1968).
9. J. Trojanowski, Postepy Mikrobiol., 6, 151 (1967).
10. J. Trojanowski, Int. Biodetn. Bull., 5, 119 (1969).
11. K. E. Eriksson, U. Lindholm, Svensk Papperstidn., 74, 701 (1971).
12. R. F. Christman, R. T. Oglesby, В кн. Lignins (ed. K. V. Sarkanen & C. H. Ludwig). N. Y.—London—Sydney—Toronto, John Wiley & Sons, Inc., 1971, стр. 769.
13. T. K. Kirk, Ann. Rev. Phytopathol., 9, 185 (1971).
14. T. Higuchi, Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 34, 207 (1971).
15. W. Flraig, Proc. IVth Intern. Congr. Biochem., Vienna, 1958, 2, 227 (1959).
16. K. Haider, Mushroom Sci., 1968, 139.
17. J. P. Martin, K. Haider, Soil Sci., 111, 54 (1971).
18. K. S. G. Cartwright, W. P. K. Findlay, Decay of timber and its prevention, London, Her Majesty's Stationery Office, 1958.
19. J. C. Mueller, Pulp Paper Mag. Can., 71, № 22, 72 (1970).
20. M. M. Pandila, Там же, 74, T78 (1973).
21. О. П. Грушников, В. В. Елкин, Достижения и проблемы химии лигнина. «Наука», М., 1973.
22. См. ¹⁸, стр. 111—162.
23. M. K. Nobles, Canad. J. Res., 26C, 281 (1948).
24. W. Bawendamm, Ztschr. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz., 38, 257 (1928).
25. R. W. Davidson, W. A. Campbell, D. J. Blaisdell, J. Agr. Res., 57, 683 (1938).
26. K. S. G. Cartwright, W. P. K. Findlay, Ann. Appl. Biol., 29, 219 (1942).
27. G. Fahraeus, Kgl. Lantbruks Högskol. Ann., 16, 618 (1949).
28. T. Higuchi, J. Japan. Forest. Soc., 35, 77 (1953).
29. T. Higuchi, K. Kitamura, Там же, 35, 350 (1953).
30. T. Higuchi, Там же, 36, 22 (1954).
31. H. Lyr, Planta, 50, 359 (1958).
32. А. Н. Шибирин, Биологически активные вещества высших грибов. «Наука», М.—Л., 1965, стр. 126—139.

33. *H. Lyr*, *Planta*, **48**, 239 (1956).
 34. *H. Lyr*, *Biochem. Ztschr.*, **329**, 91 (1957).
 35. *G. Lindeberg*, *Physiol. Plantarum*, **1**, 196 (1948).
 36. *G. Fahraeus*, *Proc. Intern. Botan. Congr.*, Stockholm 1950, **7**, 161 (1953).
 37. *G. Lindeberg*, *Ztschr. Pflanzenernähr., Düng. Bodenk.*, **69**, 142 (1955).
 38. *R. Rösch*, *Arch. Mikrobiol.*, **38**, 73 (1961).
 39. *R. Rösch*, *Naturwiss.*, **49**, 44 (1962).
 40. *R. Rösch*, *Arch. Mikrobiol.*, **43**, 392 (1962).
 41. *R. Rösch*, *Naturwiss.*, **49**, 522 (1962).
 42. *R. Rösch*, *Arch. Mikrobiol.*, **44**, 344 (1963).
 43. *R. Rösch*, *Там же*, **54**, 80 (1966).
 44. *J. W. Koenigs*, *Там же*, **73**, 121 (1970).
 45. *S. Gottlieb*, *J. H. Geller*, *Science*, **110**, 189 (1949).
 46. *T. Higuchi*, *I. Kawamura*, *I. Hayashi*, *J. Japan Wood Res. Soc.*, **2**, 31 (1956).
 47. *K. Haider*, *S. Lim*, *W. Flraig*, *Holzforschung*, **18**, 81 (1964).
 48. *K. Haider*, *Zent. Bakteriol., Parasitenk., Infektionskr. Hyg.*, *Abt. I, Orig.*, **198**, 308 (1965).
 49. *T. Fukuzumi*, *T. Shibamoto*, *J. Japan Wood Res. Soc.*, **11**, 248 (1965).
 50. *T. Fukuzumi*, *H. Takatuka*, *K. Minami*, *Arch. biochem. biophys.*, **129**, 396 (1969).
 51. *T. K. Kirk*, *A. Kelman*, *Phytopathol.*, **55**, 739 (1965).
 52. *T. C. Sheffer*, *U. S. Dep. Agr., Tech. Bull.*, **1936**, № 527.
 53. *H. Meier*, *Holz Roh-Werkstoff*, **13**, 323 (1955).
 54. *E. B. Cowling*, *U. S. Dep. Agr., Tech. Bull.*, **1961**, No. 1258.
 55. *W. Liese*, *Holz Roh-Werkstoff*, **22**, 289 (1964).
 56. *M. P. Levi*, *J. Inst. Wood Sci.*, **1964**, № 12, 56.
 57. *R. Schmid*, *W. Liese*, *Arch. Mikrobiol.*, **47**, 260 (1964).
 58. *W. W. Wilcox*, *Forest Prod. J.*, **15**, 255 (1965).
 59. *B. Н. Сергеева*, *З. Н. Крейцберг*, *Н. О. Озолиня*, *Химия древесины*, **6**, 53 (1970).
 60. *A. Apenitis*, *H. Erdtman*, *B. Leopold*, *Svensk Kem. Tidskr.*, **63**, 195 (1951).
 61. *B. Leopold*, *Там же*, **63**, 260 (1951).
 62. *T. Enkvist*, *E. Solin*, *U. Maunula*, *Paperi ja Puu*, **36**, № 3, 65 (1954).
 63. *T. Higuchi*, *I. Kawamura*, *H. Kawamura*, *J. Japan. Forest. Soc.*, **37**, 298 (1955).
 64. *H. Ishikawa*, *W. J. Schubert*, *F. F. Nord*, *Arch. biochem. biophys.*, **100**, 131 (1963).
 65. *S. Thivend*, *P. Lebreton*, *Revue ATIP*, **23**, 313 (1969).
 66. *K. Hata*, *Holzforschung*, **20**, 142 (1966).
 67. *T. K. Kirk*, *K. Lundquist*, *Svensk Papperstidn.*, **73**, 294 (1970).
 68. *H. Ishikawa*, *T. Oki*, *J. Japan Wood Res. Soc.*, **10**, 207 (1964).
 69. *H. Ishikawa*, *T. Oki*, *Там же*, **12**, 101 (1966).
 70. *T. Fukuzumi*, *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **24**, 728 (1960).
 71. *K. Konishi*, *Y. Inoue*, *J. Japan Wood Res. Soc.*, **17**, 209 (1971).
 72. *K. Konishi*, *Y. Inoue*, *Там же*, **17**, 214 (1971).
 73. *K. Konishi*, *Y. Inoue*, *Там же*, **17**, 255 (1971).
 74. *K. Konishi*, *Y. Inoue*, *T. Higuchi*, *Там же*, **18**, 571 (1972).
 75. *C. Steelink*, *T. Reid*, *G. Tollin*, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 4048 (1963).
 76. *C. Steelink*, *Adv. Chem. Ser.*, **59**, 51 (1966).
 77. *З. Н. Крейцберг*, *Б. Н. Сергеева*, *М. Я. Эйтвиде*, *Химия древесины*, **6**, 71 (1970).
 78. *R. Ferm*, *K. P. Kringstad*, *E. B. Cowling*, *Svensk Papperstidn.*, **75**, 859 (1972).
 79. *E. S. Caldwell*, *C. Steelink*, *Biochim. biophys. acta*, **184**, 415 (1969).
 80. *T. Ishihara*, *M. Miyazaki*, *J. Japan Wood Res. Soc.*, **18**, 415 (1972).
 81. *T. K. Kirk*, *E. Adler*, *Acta Chem. Scand.*, **23**, 705 (1969).
 82. *M. W. Bray*, *T. M. Andrews*, *Ind. Eng. Chem.*, **16**, 137 (1924).
 83. *D. Narayananmurti*, *J. George*, *Compos. Wood*, **1**, 51 (1954).
 84. *J. Savard*, *A. M. André*, *Centre tech. forestier trop.*, **1956**, *Publ.*, № 10.
 85. *H. Grohn*, *W. Deters*, *Holzforschung*, **13**, 8 (1959).
 86. *J. C. Pew*, *P. Weyna*, *Tappi*, **45**, 247 (1962).
 87. *W. Brown*, *E. B. Cowling*, *S. I. Falkehag*, *Svensk Papperstidn.*, **71**, 811 (1968).
 88. *T. K. Kirk*, *E. Adler*, *Acta Chem. Scand.*, **24**, 3379 (1970).
 89. *T. K. Kirk*, *S. Larsson*, *G. E. Miksche*, *Там же*, **24**, 1470 (1970).
 90. *S. Larsson*, *G. E. Miksche*, *Там же*, **21**, 1970 (1967).
 91. *S. Larsson*, *G. E. Miksche*, *Там же*, **23**, 917 (1969).
 92. *S. Larsson*, *G. E. Miksche*, *Там же*, **23**, 3337 (1969).
 93. *M. E. K. Henderson*, *Nature*, **175**, 634 (1955).
 94. *T. K. Kirk*, *J. M. Harkin*, *E. B. Cowling*, *Biochim. biophys. acta*, **165**, 145 (1968).
 95. *Б. И. Билай*, *О. Н. Антропова*, *Р. В. Войцеховский*, *ДАН УССР*, *сер. Б*, № 6, 557 (1970).
 96. *О. Н. Антропова*, *Кандид. диссерт.* *Ленингр. лесотехнич. акад.*, *Ленинград*, 1973.
 97. *K. Minami*, *T. Fukuzumi*, *J. Japan. Forest. Soc.*, **38**, 225 (1956).
 98. *T. Fukuzumi*, *T. Hiyama*, *K. Minami*, *J. Japan Wood Res. Soc.*, **11**, 175 (1965).

99. V. C. Farmer, M. E. K. Henderson, J. D. Russell, *Biochim. biophys. acta*, **35**, 202 (1959).
100. H. Shimazono, F. F. Nord, *Arch. biochem. biophys.*, **87**, 140 (1960).
101. T. S. Raman, E. R. B. Shanmugasundaram, *J. Bacteriol.*, **84**, 1339 (1962).
102. V. C. Farmer, M. E. K. Henderson, J. D. Russell, *Biochem. J.*, **74**, 257 (1960).
103. J. D. Russell, M. E. K. Henderson, V. C. Farmer, *Biochim. biophys. acta*, **52**, 565 (1961).
104. T. Ishihara, M. Miyazaki, *J. Japan Wood Res. Soc.*, **16**, 181 (1970).
105. T. Ishihara, M. Miyazaki, Там же, **16**, 185 (1970).
106. T. Fukuzumi, *J. Japan Wood Res. Soc.*, **5**, 222 (1959).
107. H. Ishikawa, W. J. Schubert, F. F. Nord, *Arch. biochem. biophys.*, **100**, 140 (1963).
108. K. Minami, M. Tsuchiya, T. Fukuzumi, *J. Japan Wood Res. Soc.*, **11**, 179 (1965).
109. J. Trojanowski, A. Leonowicz, B. Hampel, *Acta microbiol. Polon.*, **15**, 17 (1966).
110. J. Trojanowski, A. Leonowicz, M. Wojtas, Там же, **15**, 215 (1967).
111. J. Trojanowski, A. Leonowicz, *Mikrobiol.*, **1**, 247 (1970).
112. K. Lundquist, *Acta Chem. Scand.*, **24**, 889 (1970).
113. H. Ishikawa, W. J. Schubert, F. F. Nord, *Biochem. Ztschr.*, **338**, 153 (1963).
114. T. Fukuzumi, K. Minami, T. Shibamoto, *J. Japan Wood Res. Soc.*, **5**, 96 (1959).
115. T. Fukuzumi, *Agr. Biol. Chem.*, **26**, 447 (1962).
116. R. K. Crowdson, *Canad. J. Microbiol.*, **13**, 181 (1967).
117. K. Moore, G. H. N. Towers, *Canad. J. Biochem.*, **45**, 1659 (1967).
118. K. Moore, P. V. Subba Rao, G. H. N. Towers, *Life Sci.*, **6**, 2629 (1967).
119. W. Flraig, K. Haider, *Arch. Mikrobiol.*, **40**, 212 (1961).
120. K. Haider, S.-U. Lim, W. Flraig, *Landwirtsch. Forsch.*, **15**, 196 (1962).
121. W. Flraig, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **28**, 1523 (1964).
122. R. Y. Stanier, J. L. Ingraham, *J. Biol. Chem.*, **210**, 799 (1954).
123. D. L. MacDonald, R. Y. Stanier, J. L. Ingraham, Там же, **210**, 809 (1954).
124. S. R. Gross, R. D. Gafford, E. L. Tatum, Там же, **219**, 781 (1956).
125. E. L. Tatum, S. R. Gross, Там же, **219**, 797 (1956).
126. L. Ottey, E. L. Tatum, Там же, **223**, 307 (1956).
127. W. C. Evans, *J. Gen. Microbiol.*, **32**, 177 (1963).
128. Г. Х. Н. Туэрс, В кн. *Биохимия фенольных соединений*, «Мир», М., 1968, гл. 7.
129. K. Haider, K. Grabbe, *Zent. Bakteriol., Parasitenkr., Infektionskr. Hyg.*, Abt. I, Orig., **205**, 91 (1967).
130. T. K. Kirk, J. M. Harkin, E. B. Cowling, *Biochim. biophys. acta*, **165**, 134 (1968).
131. K. Freudenberg, *Science*, **148**, 595 (1965).
132. Д. Пью, В. Коннорс, А. Куниши, В сб. *Химия и биохимия лигнина, целлюлозы и гемицеллюлоз*. «Лесная пром-сть», М., 1969, стр. 107.
133. J. C. Pew, *J. Org. Chem.*, **28**, 1048 (1968).
134. C. Steelink, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 2056 (1965).
135. C. Steelink, *Tetrahedron Letters*, **1966**, 105.
136. K. Freudenberg, J. M. Harkin, M. Reichert, T. Fukuzumi, *Chem. Ber.*, **91**, 581 (1958).
137. K. Lundquist, G. E. Miksche, *Tetrahedron Letters*, **1965**, 2131.
138. H. Nimz, *Chem. Ber.*, **98**, 3160 (1965).
139. K. Lundquist, G. E. Miksche, L. Ericsson, L. Berndtson, *Tetrahedron Letters*, **1967**, 4587.
140. J. M. Harkin, В кн. A. R. Battersby, W. I. Taylor, *Oxidative Phenol Coupling*, N. Y., Marcel Dekker, Inc., 1967, стр. 243.
141. J. C. Pew, W. J. Connors, *Nature*, **215**, 623 (1967).
142. K. Freudenberg, A. C. Neish, *Constitution and biosynthesis of lignin*, Berlin — Heidelberg — N. Y., Springer-Verlag, 1968, стр. 103.
143. J. Gierer, A. E. Opara, *Acta Chem. Scand.*, **27**, 2909 (1973).
144. J. C. Pew, W. J. Connors, *J. Org. Chem.*, **34**, 580 (1969).
145. J. C. Pew, W. J. Connors, Там же, **34**, 585 (1969).
146. M. Young, C. Steelink, *Phytochem.*, **12**, 2851 (1973).
147. C. Steelink, *Recent Adv. Phytochem.*, **4**, 239 (1972).
148. М. Я. Екабсоне, З. Н. Крейцберг, В. Н. Сергеева, *Химия древесины*, **11**, 47 (1972).
149. М. Я. Екабсоне, З. Н. Крейцберг, В. Н. Сергеева, Там же, **13**, 27 (1973).
150. З. Н. Крейцберг, М. Я. Екабсоне, Там же, **14**, 119 (1973).
151. См. ²¹, стр. 281.

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
АН СССР, Москва
Украинский н. и. ин-т бумажной
промышленности, Киев