

# Моделирование биodeградации многокомпонентного органического вещества в водной среде.

## 3. Анализ механизмов деструкции лигнина

Т. Н. Губернаторова, Б. М. Долгоносков

Институт водных проблем Российской академии наук

119333 Москва, ул. Губкина, 3

*Аннотация.* Рассматриваются механизмы ферментативной деструкции стойкого органического вещества на примере лигнина. Описываются основные группы микроорганизмов-деструкторов лигнина и их ферментные системы. Проводится анализ биохимических механизмов действия основных лигнинразрушающих ферментов. Оцениваются типичные размеры молекул ферментов. Рассматриваются структурные изменения при деструкции лигнина. На основе проведенного анализа формулируются основные закономерности деструкции лигнина, необходимые для построения модели кинетики этого процесса.

*Ключевые слова:* стойкое органическое вещество, лигнин, водная среда, механизмы деструкции.

### ВВЕДЕНИЕ

Известно, что деструкция стойкого органического вещества, в том числе лигнина, осуществляется ферментными системами грибов в присутствии кислорода. Молекулы ферментов инициируют распад связей в органических макромолекулах, вызывая образование низкомолекулярных продуктов, которые затем вовлекаются в метаболизм микроорганизмов и минерализуются. Деструкция лигнина, протекающая при распаде древесных остатков, хорошо изучена. Описаны группы наземных лигнинразрушающих грибов и их ферментные системы, предложены биохимические механизмы действия ферментов на субстрат. Намного менее изучены процессы деструкции в водной среде. Есть свидетельства, что в разрушении технических лигнинов, поступающих в водные объекты суши со стоками целлюлозно-бумажного производства, участвуют грибы, разрушающие стойкие фракции лигнина [25, 54]. В последнее время начали интенсивно развиваться исследования по деструкции стойкого органического вещества в морской воде и донных осадках (см. например [51, 62, 101, 102,

112]). Эти исследования вскрыли ряд интересных фактов, касающихся присутствия кислорода в морской воде на больших глубинах, проникновения кислорода в глубоководные донные осадки, наличия и разнообразия грибов в этих средах, спектра выделяемых ими ферментов. Полученная информация крайне важна, во-первых, в связи с проблемой загрязнения мирового океана стойкими соединениями и, во-вторых, для оценки составляющих глобального цикла углерода, прежде всего, скорости минерализации органического вещества и его захоронения в донных осадках. Понятно, что в глубоководной среде присутствует в основном стойкое органическое вещество, так как лабильные фракции распадаются в процессе длительной седиментации частиц в водной толще. В свете новых данных есть основания считать, что деструкция стойкого органического вещества в водной среде в аэробных условиях так же, как и на суше, осуществляется грибами. Для количественных оценок скорости деструкции необходимо разработать модель кинетики процесса, которая вобрала бы в себя основные биохимические закономерности действия ферментов на субстрат. Необходимо взглянуть на эти закономерности с кинетической точки зрения, с акцентом на механизмы распада макромолекул. В качестве типичного представителя будет рассмотрен лигнин, структура и свойства которого были подробно описаны в предыдущей статье. Вопросы, на которые предстоит ответить, состоят в следующем: 1) какие грибы осуществляют деструкцию стойкого органического вещества в водной среде, с помощью каких ферментов, какие условия для этого необходимы; 2) каков химический механизм распада макромолекул лигнина, как он пространственно организован; как влияют особенности структуры макромолекулы и ее поверхности на взаимодействие с ферментом; каково соотношение размеров макромолекулы и фермента; 3) какие фрагменты образуются в элементарных актах распада и какова их дальнейшая судьба. Рассмотрим перечисленные проблемы, привлекая для этого сведения из обширного литературного материала.

## ГРИБЫ В ВОДНОЙ СРЕДЕ

В водной среде и осадках обнаружено богатое разнообразие грибов, большинство из которых принадлежит к наземным разновидностям [51]. Roth et al. [102] впервые выделили морские виды грибов из океанической воды северо-западного субтропического района Атлантического океана с глубины 4450 м. Авторы [79] сообщали об облигатных морских грибах, обнаруженных на деревянных панелях, погруженных на глубину 500–3000 м.

Raghukumar et al. [100] одни из первых опубликовали сообщение о глубоководных грибах *Aspergillus ustus*, которые выделены из известковых осадков Бенгальского залива с глубины 965 м. Впоследствии в работах [83, 128] были описаны эксперименты по культиви-

рованию дрожжевых и мицелиальных грибов в условиях, схожих с условиями глубоководных осадков. Takami et al. [111] показали присутствие грибов и дрожжей в образцах осадков, взятых из Марианской впадины с глубины 10500 м в Тихом океане. Позднее [112] они были идентифицированы как *Penicillium lagena* и *Rhodotorula mucilaginosa*, соответственно. В [101] также сообщалось о присутствии глубоководных грибов, которые были непосредственно определены и выделены из колонок осадков глубиной 4.7 м из впадины Чагос (Chagos Trench) в Индийском океане с глубины 5000 м.

В [51] продолжены исследования микрофлоры глубоководных океанических осадков. Авторы установили наличие грибных культур, изолировали и идентифицировали их, провели лабораторные эксперименты по культивированию грибов в схожих условиях. Сравнение некоторых выделенных образцов глубоководных грибов с обычными наземными видами показало, что спорообразующие микроорганизмы вполне способны развиваться в условиях больших глубин, где они существуют не только в виде спор и гифов, но и как мицелиальные скопления. Мицелиальное состояние грибов является следствием активного вегетационного роста в данных условиях внутри осадков или в виде вкраплений в частицах органического вещества. Количество грибной массы в извлекаемых с различной глубины образцах осадков было примерно одинаковым, что указывает на однородность осадка в области пробоотбора. Лабораторные экспериментальные исследования показали, что наземные виды грибов, помещенные в глубоководные осадки, после стадии стресса постепенно адаптируются к имеющимся условиям окружающей среды, в том числе к высокому давлению, изменяющейся температуре и нестабильному содержанию органического вещества. Часть грибных культур вполне нормально адаптировалась самостоятельно в условиях высокого давления и низкой температуры (авторы исследовали четыре вида грибов: три наземных и один глубоководный).

В цитируемой работе изучалось распространение грибов в глубоководных донных осадках в центральной части Индийского океана. Пробы отбирались с глубины в 5000 м. В ходе исследования авторы выделили в общей сложности 181 культуру грибов с преобладанием наземных разновидностей спороносных грибов. Представители микрофлоры глубоководных осадков относятся к родам *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium*. Наблюдалось также присутствие некоторых видов неспороносных и дрожжевых грибов. Вид *Aspergillus terreus* является наиболее типичным для всех выделенных образцов. Авторы установили наличие гифов грибов в осадках. В общей сложности 25 разновидностей грибов рода *Aspergillus* производили существенное количество биомассы в модельных условиях, имитирующих условия глубоководной среды (давление 200 бар и температура 5°C и 30°C). Отмечалось, что низкая температура оказывает большее негативное воздействие на

рост грибов, чем высокое давление. Ранее [55] при исследовании рода *Aspergillus* установлено, что эта культура физиологически весьма универсальна, наиболее значима в осадках и способна колонизировать широкий спектр субстратов. Damare et al. [51] подтвердили эти сведения и установили, что этот род морфологически относится к наземным формам грибов. Однако способность адаптироваться к глубоководным условиям могла стать генетической модификацией.

В отношении того, каким образом наземные формы грибов могли попасть в глубоководные осадки, авторы [51] полагают, что они могли быть перемещены на океаническое дно в виде гифов, которые проросли на частичках органического вещества терригенного происхождения (частично разложившихся листьях, кусочках древесины). Кроме того, в воду могли попасть споры грибов вследствие выдувания ветром с поверхности земли. В [115] сообщалось о присутствии кусочков древесины на больших глубинах, которые появляются вследствие смыва при затоплении деревьев в период муссонов в тропиках или во время весеннего половодья. Не исключено, что даже субстраты чисто океанического происхождения находящиеся на поверхности воды способны заселяться грибными культурами.

В [54] исследовалось обесцвечивание окрашенной воды, загрязненной стоками целлюлозно-бумажной, текстильной, лакокрасочной промышленности, выделенными из донных отложений морскими грибами, которые культивировались на остатках полуразложившейся древесины мангровых лесов (идентификация грибов не проводилась). Авторы установили, что лакказы были доминирующим лигнинразрушающим ферментом, который выделялся грибами. Кроме лакказы фиксировалась слабая активность ферментов марганецпероксидазы и лигнинпероксидазы. Выделение лакказы увеличивалось в присутствии фенольных и нефенольных индукторов. Увеличение продукции лакказы отмечалось также после обработки окрашенных стоков. Вода, содержащая промышленные загрязнители и синтетические красители, довольно быстро обесцвечивалась при внесении туда образцов растущей грибной культуры. Плавающая на поверхности воды часть культуры, не имея значительной биомассы, также вполне эффективно обесцвечивала загрязненную воду в течение 6-часовой инкубации.

Продолжаются исследования и других ферментов, выделяемых глубоководными видами грибов. В [52] была изучена щелочно- и холодо-толерантная протеаза, выделяемая глубоководными грибами. Протеаза относится к ферментам из класса гидролаз и расщепляет пептидную связь между аминокислотами в белках. Авторы исследовали 221 вид глубоководных грибов, выделенных из осадков с глубины 5000 м в центральной части Индийского океана. Эти образцы были исследованы на предмет содержания протеазы. Этот фермент в больших количествах производил вид *Aspergillus ustus*. Рост грибной культуры осуществлялся при температурах 5 и 30°C и при давлении, возрастающем от 1 до 300 бар. Найдены условия,

в которых проявляется наибольшая ферментная активность. Интересно, что максимум ферментной активности не совпадает с максимумом биомассы грибной культуры.

Грибы могут существовать только в аэробных условиях, и поэтому обнаружение грибов в водной среде служит косвенным подтверждением присутствия кислорода. Однако прямые измерения содержания кислорода в глубоководных осадках были проведены только в последнее время. В [62] исследована скорость потребления кислорода бентосной микрофлорой. Для этой цели отбирались колонки осадков из различных пространственных точек центральной части Тихого океана, в которых измерялось содержание кислорода. Полученные вертикальные профили концентрации кислорода показывают, что осадки оксигенированы даже на глубине 8 м под поверхностью осадка. На поверхности осадка концентрация кислорода составляла примерно 200 мкмоль  $O_2/л$ , а на глубине 8 м варьировала от места к месту в пределах 150–180 мкмоль  $O_2/л$ . При этом поток кислорода в донные отложения был порядка 0.1 мкмоль  $O_2/м^2/сут$ . Он сохраняется на этом же уровне при углублении в осадок, что указывает на чрезвычайно низкие скорости кислородообмена и свидетельствует о низкой микробной активности и медленном разложении органического вещества. Проведенная авторами экстраполяция кислородных профилей в толщу осадка на большие глубины позволила сделать вывод, что осадки оксигенированы вплоть до базальтового основания. Толщина осадка над основанием варьировала от 6 до 60 м. Типичная концентрация кислорода вблизи базальтового основания по этим оценкам находится на уровне 100 мкмоль  $O_2/л$ , т.е. всего лишь в 2 раза меньше, чем на поверхности осадка.

Присутствие кислорода в осадках создает условия для жизнедеятельности не только грибов, но и аэробных бактерий, которые утилизируют низкомолекулярные продукты деструкции стойкого органического вещества — процесса, который осуществляют грибы. Недавно были выделены и идентифицированы новые виды бактерий рода *Brevibacterium*, обитающие в глубоководных осадках [36]. Пробоотбор донного осадка осуществлялся с глубины 5904 м, углубление в осадок составляло 4.6 м. На этом уровне возраст осадка датируется 50000 лет.

Таким образом, можно констатировать, что кислород присутствует на большой глубине не только в воде, но и проникает в глубоководные осадки, обеспечивая необходимые условия для существования грибов. Близкая природа водных и наземных грибов позволяет при описании деструкции органического вещества в водной среде использовать сведения, полученные для наземных грибов, которые рассматриваются ниже.

## ЛИГНИНРАЗРУШАЮЩИЕ ГРИБЫ И ИХ ФЕРМЕНТНЫЕ СИСТЕМЫ

Биодеструкция естественных высокомолекулярных субстратов, в том числе лигнина, — многоступенчатый полиферментный процесс, осуществляемый грибами. Часть ферментов грибов (т.н. конститутивные ферменты) формируется в процессе онтогенеза, а другая часть (адаптивные) появляется впоследствии в зависимости от условий окружающей среды. Индукторами ферментов могут быть соответствующие субстраты или мономерные продукты производимых ими реакций. Конститутивные ферменты продуцируются не сразу, а в определенной последовательности, их набор в зависимости от возраста культуры сильно меняется по количественным соотношениям и качественному составу [3, 8, 9]. Ферментные системы грибов весьма подвижны, способны подстраиваться к условиям среды и составу органического вещества, обеспечивая, с одной стороны, высокую адаптивность грибов к изменяющимся внешним условиям, а с другой, непрерывающуюся переработку стойкого органического вещества в самых разных условиях.

Во внешней среде ферменты проявляют каталитическую активность в течение длительного времени [10, 11, 27]. Есть свидетельства, что они могут долго сохраняться в морской воде и осадках [94–96]. В водной среде ферменты способны диффундировать в мезопоры взвеси, где они защищены от бактериальной атаки [49]. Другой механизм защиты связан с инкапсуляцией биомолекул путем создания оболочки из ассоциированных органических молекул [45, 76]. Еще несколько механизмов защиты описано в [95].

Среди наземных грибов основным поставщиком лигнинразрушающих ферментов являются грибы белой гнили, обладающие развитой ферментной системой. Она включает подсистему лигнинразрушающих ферментов, куда входят лакказы, пероксидазы (лигнинпероксидаза, марганецпероксидаза, гибридная пероксидаза, метаноксидаза и др.), тирозиназы, целлюлозодегидрогеназы, а также подсистему гидролаз, обеспечивающих разложение полисахаридов [7, 14, 21, 22]. Распад лигнина и полисахаридов для разных грибов происходит в неодинаковой степени и зависит от активности ферментных систем, причем различия в активности могут наблюдаться и у одного и того же гриба [108]. Лигнин разрушается по окислительному механизму с неизменным участием активного кислорода. Окислительные реакции обеспечивают многоступенчатое превращение макромолекул биополимера в низкомолекулярные соединения, утилизируемые сообществом грибов и бактерий [9, 22, 92, 108, 114].

Некоторое участие в трансформации лигнина принимают также грибы бурой и мягкой гнили, грибы синевы и др. [2, 15, 18–20, 28]. Бурая гниль лишь химически изменяет лигнин, понижая количество метоксильных групп и повышая содержание карбонильных и карбоксильных групп за счет реакций окислительной деструкции и деметилирования. Окисление приводит к образованию значительных количеств  $\text{CO}_2$  с потерей углерода пропановых це-

пей и метоксильных групп, но при этом потеря массы может компенсироваться введением кислорода [75]. Грибы мягкой гнили вырабатывают слабую ферментную систему по отношению к лигнину [9]. Однако для некоторых грибов этой группы была отмечена способность утилизировать дегидрополимеризаты. При этом отмечалось, что в образовании  $\text{CO}_2$  участвовали метоксильные группы, пропановые цепи и ароматические кольца [21, 22, 26]. Некоторые грибы синевы подобны по своему действию грибам мягкой гнили. Наличие ферментов, расщепляющих лигнин (фенолоксидаз), обнаружено у 19 видов грибов синевы. Большинство из них продуцирует также лакказы, в основном, как внутриклеточный фермент [19, 26].

Что касается бактерий, то они лишь в очень ограниченной степени способны разрушать лигнин, причем более заметно в смешанных культурах. Это подтвердили эксперименты с дегидрополимеризатом. Метаболизм бактерий включает последовательные реакции окисления  $\alpha$ -углеродного атома, окислительного расщепления простых арилэфирных связей и отщепления от пропановых цепей двух атомов углерода. Однако деструкция основного скелета лигнина происходит слабо [19, 26, 63]. Вообще, в аэробных условиях бактерии играют второстепенную роль в разложении лигнина по сравнению с грибами, но в условиях аноксии, когда грибы не могут функционировать, бактерии-анаэробы, участвующие в процессах денитрификации, сульфидогенеза, метаногенеза, становятся практически единственными, хотя и менее эффективными, биодеструкторами лигнина, главным образом его низкомолекулярных форм.

Отметим, что обычно лигнинразрушающие ферменты продуцируются грибами вне зависимости от наличия лигнина (в отличие от ферментов целлюлазного комплекса). Но это не всегда так. В ряде работ [1, 40, 42, 120] отмечено, что по мере развития грибов и смены механизма обмена веществ (переход от трофофазы к идиофазе из-за истощения легкоразлагаемых веществ, накопления метаболитов и истощения среды) лигнолитическая активность культур проявляется в ответ на недостаток в среде азота, углерода или серы. Эффективное действие лимита по азоту на проявление лигнинпероксидазной активности у лигнинразрушающих грибов [41, 113, 118] объяснимо с трофо-экологической точки зрения, поскольку древесина, которая является естественным субстратом для грибов белой гнили, содержит минимальное количество азота [19].

Среди других особенностей лигнолитической системы следует отметить ее неспецифичность по субстрату (в отличие от целлюлаз), а также то, что деградация лигнина осуществляется через окислительные процессы, тогда как для других биополимеров (белки, целлюлоза) деградация идет посредством гидролиза [78]. Таким образом, можно констатировать, что грибы изначально нацелены на переработку стойких субстратов и вырабатывают

для этого соответствующую неспецифическую ферментную систему широкого спектра действия.

Деструкция макромолекул лигнина под действием ферментов включает следующие группы реакций: 1) окисление боковых цепей лигнина по  $\alpha$ - и  $\beta$ -углеродным атомам с образованием структур, содержащих кетогруппы, а также с образованием фенольных структур; 2) гидролитическое расщепление  $\beta$ -O-4 эфирных связей с образованием спиртовых и фенольных структур; 3) разрушение алкиларильных C-C связей, образование *n*-хиноидных структур и альдегидных или кислотных фрагментов; 4) деметилирование и гидроксилирование ароматического кольца; 5) расщепление ароматического кольца с образованием алифатических продуктов, чаще всего карбоновых кислот.

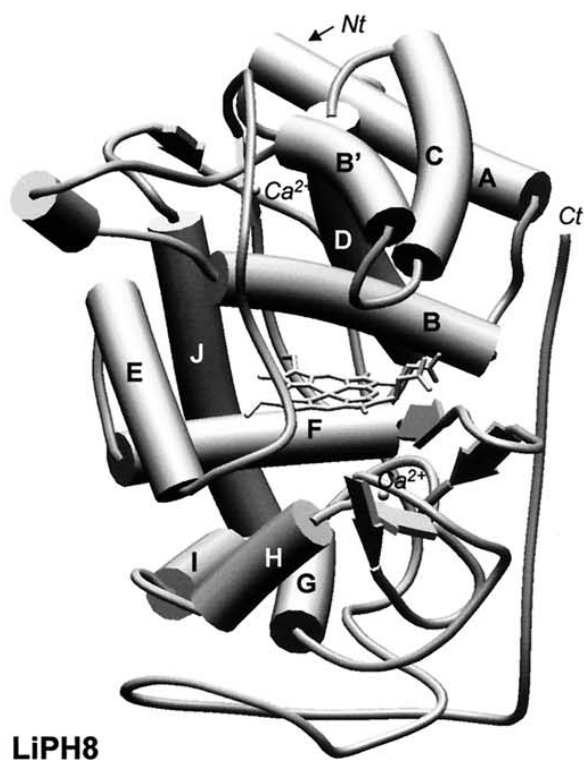
## МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ЛИГНИНРАЗРУШАЮЩИХ ФЕРМЕНТОВ

### *Лигнинпероксидазы*

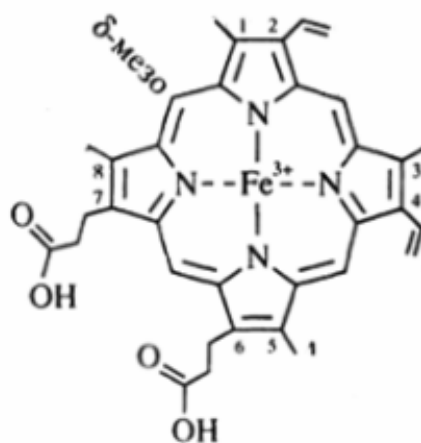
Центральное место среди ферментов принадлежит лигнинпероксидазе как наиболее эффективному ферменту, который способен катализировать ряд реакций расщепления лигнина. LiP считают ключевым ферментом в окислении нефенольных структур лигнина до катионрадикалов, подвергающихся затем серии неферментативных реакций, включающих расщепление C-C и C-O связей и фрагментацию трехмерной сетки лигнина. Структура молекулы LiP изображена на рис. 1.

Уникальная отличительная черта этой группы ферментов заключается в способности одноэлектронно окислять широкий круг диметоксифенильных субстратов с образованием катионрадикальных интермедиатов. По своему строению все изоферменты LiP — мономерные гемогликопротеины [64]. Активный центр LiP сходен с закрытой структурой активного центра HRP (horse-radish peroxidase — пероксидаза хрена) (так называемый гемовый карман) и отличается от других гемсодержащих белков: глобинов, каталазы, хлорпероксидазы и цитохрома P450, — у которых гем экспонирован наружу [53]. У изоферментов LiP ион  $Fe^{3+}$  помимо тетрапиррольного кольца протопорфирина IX (1,3,5,8-тетраметил-2,4-дивинил-6,7-карбоксиэтилпорфирин) (рис. 2) координирует также остаток имидазола белкового гистидина. По данным разных авторов у железа имеется пять [80] или шесть [32] лигандов. Целостность структуры активного центра фермента поддерживается ионами кальция.





**Рис. 1.** Молекулярная структура лигнолитической пероксидазы LiP (изофермент H8). Показаны положения гемовой группы (тетрапиррольное кольцо в центре), доменов фермента А–G, С и N концов (Ct, Nt) и двух структурных ионов  $\text{Ca}^{2+}$  [86].



**Рис. 2.** Тетрапиррольное кольцо [5].

*Каталитический цикл* LiP (рис. 3) включает двухэлектронное окисление ферри- ( $\text{Fe}^{3+}$ ) формы фермента перекисью водорода до оксоферрил- ( $\text{Fe}^{4+}\text{O}$ ) катионрадикала. Этот интермедиат в пероксидазном катализе называется соединением I (LiP I) [46]. Одноэлектронное восстановление соединения I подходящим субстратом (например, вератровым спиртом —

VA), ведет к образованию второго интермедиата, соединения II (LiP II), в котором порфириновый катионрадикал отсутствует, но сохраняется феррил-производное гема (оксоферрилгем). Соединение II может далее осуществлять одноэлектронное окисление подходящих субстратов, возвращаясь к исходной ферри-форме фермента, чем и завершается каталитический цикл [124]. В отсутствие подходящих одноэлектронных восстановителей соединение II может подвергаться серии реакций с избытком перекиси, образуя оксикомплекс (оксиферрогем), называемый соединением III (LiP III) (неактивная форма фермента) [105, 123].

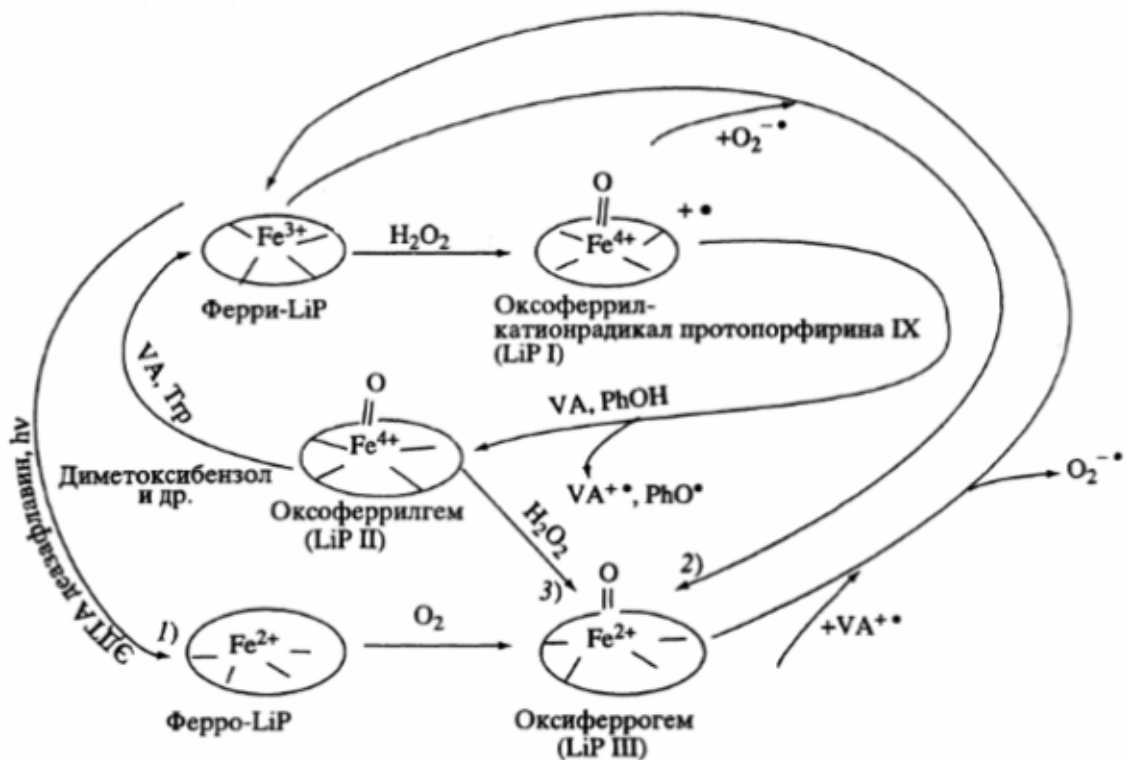


Рис. 3. Каталитический цикл LiP [46].

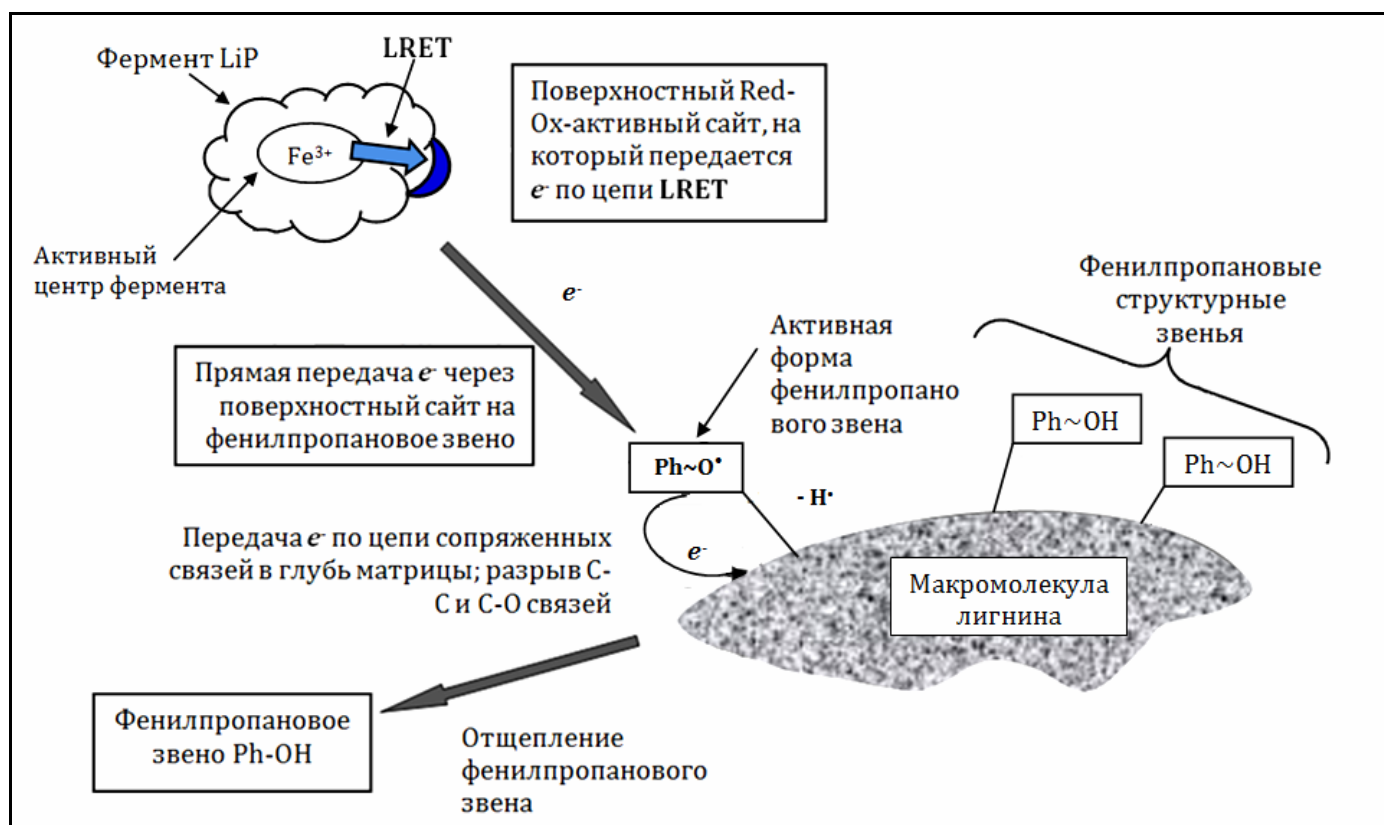
Таким образом, взаимодействие LiP с перекисью может приводить к образованию не менее трех хорошо изученных интермедиатов, обладающих разными скоростями превращения в исходный фермент. Наиболее активным интермедиатом является соединение I, затем следует соединение II, а соединение III, образуемое при восстановлении последнего избытком перекиси, является наименее реакционноспособным.

Завершение каталитического цикла фермента и возможность стационарного протекания каталитической реакции требуют таких условий, при которых соединение II и тем более соединение III не накапливаются и не становятся тупиковыми формами. Работы [106, 107]

показывают определенную способность соединений I и II фермента непосредственно окислять высокомолекулярный белковый субстрат.

Это находится в противоречии с кристаллографическими исследованиями структуры LiP [22], которые свидетельствуют о полном погружении гема в белковую глобулу и его неспособности непосредственно взаимодействовать с высокомолекулярными субстратами.

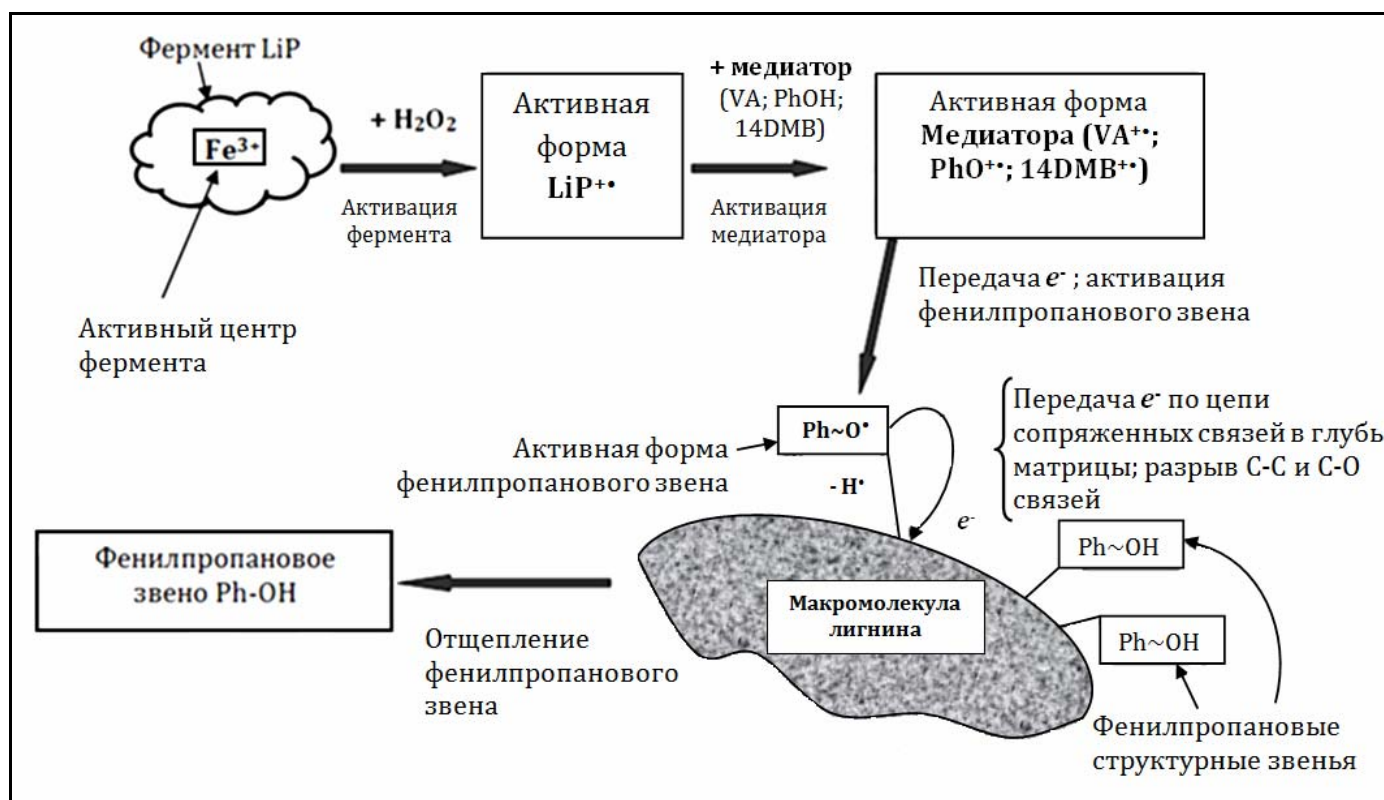
Тем не менее, ферроцитохром *c* (обозначается  $Сс^{2+}$ ) окисляется системой LiP/ $H_2O_2$  в отсутствие VA. Для объяснения этого явления предложен механизм непосредственного действия фермента на полимерный субстрат, который основан на переносе электрона из гемового кармана на поверхность глобулы по длинной цепи (LRET — long-range electron transfer) (рис. 4). Перенос электрона с гема цитохрома *c* на гем LiP, как полагают, происходит через поверхностное белок-белковое взаимодействие [126]. Такой же механизм с участием LRET предложен для цитохром-*c*-пероксидазы (CCP) [34, 93].



**Рис. 4.** Механизм LRET действия фермента.

Другой механизм предполагает, что деполимеризация лигниновой матрицы и других высокомолекулярных субстратов опосредуется низкомолекулярным диметоксифенильным медиатором типа VA или 14DMB (1,4-диметоксибензол), образующим под действием фермента стабильную катионрадикальную частицу (рис. 5).

Известно, что окислительная деполимеризация LiP модельных димеров лигнина с разными типами связей не требует участия медиатора. В последние годы показано, что не только димеры, но и более высокие олигомеры, которые вряд ли способны проникать в канал доступа к гему, а также дегидрокониферильный полимер (DHP) — аналог елового лигнина — могут разрушаться ферментом напрямую, предположительно через экспонированный наружу редокс-центр [90]. Полагают, что LiP, вероятно, имеет несколько субстратных площадок, причем пока не ясно, как они расположены по отношению к  $\delta$ -мезосайту гема (см. рис. 2), который сообщается с поверхностью глобулы через узкий канал. Это касается связывания не только полимерных, но и низкомолекулярных субстратов [5].



**Рис. 5.** Механизм действия фермента через медиатор. Следует отметить, что к настоящему времени механизм действия лигнинпероксидазы достаточно подробно изучен лишь для модельных соединений лигнина [56, 68, 70, 125]. Известно, что лигнинпероксидаза катализирует следующие реакции: расщепление ароматического кольца [116], расщепление  $C_{\alpha}$ – $C_{\beta}$  связей в арилглицерин- $\beta$ -ариловых эфирах [77], расщепление  $\beta$ –O–4 связей [127], окисление до хинонов и спиртов [41], деметилирование и окисление до фенолов [61]. Пути деструкции димерных соединений лигнина описаны в [16], где дана исчерпывающая информация о роли лигнинпероксидазы в реакциях биоокисления модельных соединений с  $\alpha$ - и  $\beta$ –O–4 связями, доминирующими в лигнине.

Подчеркнем, что кислород играет решающую роль в функционировании лигнинпероксидазы. При окислении LiP ароматических субстратов кислород отвечает за образование пероксирадикалов, которые могут затем вовлекать в цепные неферментативные реакции новые молекулы субстрата, значительно ускоряя его превращение. Но особенно важно присутствие кислорода для преодоления рекомбинации углеродных радикалов, образуемых при выбросе протона катионрадикалами — непосредственными продуктами LiP. Иначе вместо деструкции идет обратный процесс — сшивка радикалов и накопление димеров и олигомеров, как при образовании лигнина. Кроме того, продукты восстановления пероксирадикалов ионами  $Mn^{2+}$  или иным подходящим восстановителем — гидропероксидами — возможно, участвуют во вторичных ферментативных процессах, заменяя пероксид водорода при образовании соединения LiP I.

В итоге можно констатировать, что лигнинпероксидаза катализирует следующие реакции: расщепление C–C связей между фенилпропановыми звеньями, окисление бензиловых спиртов, расщепление эфирных связей, окисление метильных заместителей в бензильных соединениях, гидроксирование бензильных метильных групп, расщепление ароматического кольца, декарбоксилирование щавелевой кислоты, полимеризация фенолов.

#### *Марганецпероксидазы*

Вторым по значимости ферментом в процессе разложения лигнина грибами-возбудителями белой гнили является марганецпероксидаза (MnP) [122]. Способность непосредственно окислять  $Mn^{2+}$  до  $Mn^{3+}$  — это уникальное свойство MnP *P. chrysosporium* и многих других грибов [71]. Некоторые ферменты, например LiP, тоже могут окислять  $Mn^{2+}$ , но не непосредственно, а благодаря супероксиданионрадикалу, который образуется в процессе редокс-цикла. Лишь некоторые MnP способны к марганецнезависимому окислению. Структура MnP сходна со структурой LiP, изображенной на рис. 1.

*Специфичность действия MnP.* Соединение MnP I окисляет не только  $Mn^{2+}$ , но и ряд органических субстратов, в то время как для восстановления соединения II в нативный фермент присутствие  $Mn^{2+}$  абсолютно необходимо. Окисление  $Mn^{2+}$  характеризуется накоплением соединения III и его реактивацией с  $Mn^{3+}$ . При условиях недостатка хелатора или при недостаточно эффективном комплексообразовании оборот фермента намного медленнее, однако образующийся  $Mn^{3+}$  более высоко реакционноспособен и разлагает перекись по каталазному типу, не допуская перевосстановления ею фермента и образования соединения III. Таким образом, основная роль ионов  $Mn^{2+}$  заключается в предотвращении накопления соединения MnP III, причем в зависимости от условий их защитный эффект может иметь разный механизм [121, 123].

При окислении олигомерных фенольных моделей лигнина соединение I MnP значительно реакционноспособнее соединения II, но гораздо менее реакционноспособно, чем LiP I. Таким образом, несмотря на способность окислять фенолы, этот фермент имеет единственный физиологически значимый субстрат — ионы  $Mn^{2+}$ , — без которого его соединение II является тупиковой формой фермента, тормозящей оборот биокатализатора. Иначе говоря, MnP может окислять олигомеры лигнина в стационарном режиме только в присутствии ионов марганца в качестве редокс-медиаторов [33]. Вместе с тем, MnP способна запускать многочисленные неферментативные процессы, инициируемые комплексами  $Mn^{3+}$  или вторичными медиаторами. Так, MnP может поддерживать свободнорадикальные процессы, протекающие по типу реакций Хабера–Вайса или Фентона, причем в ряде случаев она может обеспечивать себя перекисью через дисмутацию супероксид-аниона, образуемого при восстановлении кислорода радикалами карбоновых кислот [31, 117].

Образование марганецпероксидазой свободно диффундирующих низкомолекулярных окислителей, основным из которых является хелатированный ион  $Mn^{3+}$ , позволяет ей наряду с LiP участвовать в деполимеризации лигнина *in vitro*, хотя, в отличие от LiP, MnP делает это опосредованно [31].

Таким образом, MnP служит мощным внеклеточным агентом опосредованного воздействия на лигнин. Она обладает ценным качеством — способностью обеспечивать себя перекисью в результате каскада сопряженных неферментативных реакций восстановления кислорода.

#### *Гибридные пероксидазы*

Исследование грибов-возбудителей белой гнили, принадлежащих к родам *Pleurotus* и *Bjerkandera*, показало наличие у них особых форм марганецпероксидаз, отличающихся широкой специфичностью [38, 43, 44, 48, 89, 103, 117]. Эти формы объединяются в группу ферментов, называемых гибридными пероксидазами, или пероксидазами широкого спектра действия (*versatile peroxidases* — VP).

У *P. eryngii* обнаружены три типа внеклеточных пероксидаз. Одна родственна MnP *P. chrysosporium*, другая представляет собой фермент широкой специфичности VP, объединяющий каталитические свойства LiP и MnP, включая прямое окисление  $Mn^{2+}$ , а также прямое окисление фенольных и нефенольных димеров. Структура VP сходна со структурой LiP, показанной на рис. 1. От типичных MnP и LiP она отличается эффективным окислением фенолов, для которых MnP *P. chrysosporium* требует присутствия  $Mn^{2+}$ , а LiP — вератрола. Третий тип фермента (из твердофазной культуры) — промежуточная форма, которая актив-

на по отношению к  $Mn^{2+}$  и фенолам, но малоактивна к вератролу и неактивна к модельным димерам [97].

Таким образом, одна группа пероксидаз может рассматриваться как аналог *MnP* *P. chrysosporium*, а другая представляет собой ферменты широкой специфичности VP [72, 73, 89].

### *Лакказы*

Лакказы являются самыми распространенными ферментами, способными трансформировать ароматические субстраты, не ограничиваясь только метаболизмом лигнина. Лакказы обнаружены у многих возбудителей мягкой гнили, почвенных сапротрофных и фитопатогенных грибов (аскомицетов или их гифомицетных анаморфов), у большинства трутовиков — возбудителей белой гнили, а также у многих агариковых грибов, растущих на почвенном или растительном субстрате.

Лакказы принимают участие в процессах деструкции лигнина, гумификации органических остатков, детоксикации ксенобиотиков. Они отличаются широкой специфичностью и проявляют активность в широком интервале значений pH.

Из сказанного следует, что наличие разных типов пероксидаз в ферментной системе одного и того же гриба-деструктора лигнина позволяет ему адаптироваться к разным условиям функционирования, в том числе к широкому варьированию pH и концентрации эндогенного пероксида, обеспечивая непрерывающееся разложение лигнина в самых разных условиях. Устойчивость процессу деструкции лигнина придает разнообразие сосуществующих видов грибов-деструкторов с отличающимися ферментными системами.

### *Размеры ферментов*

Распад макромолекулы лигнина происходит через последовательность элементарных актов разрыва связей. Это осуществляется при подходе молекулы фермента к поверхности макромолекулы лигнина. В статье 2 данной серии были оценены размеры макромолекул, которые могут достигать нескольких сотен нанометров. В сравнении с ними молекулы ферментов имеют малые размеры (табл. 1, наряду с лигнолитическими ферментами указаны и некоторые другие типы ферментов для сравнения). По этим данным можно заключить, что лигнолитические ферменты имеют размеры в интервале 4.5–8.5 нм. Таким образом, размеры макромолекул лигнина на один–два порядка превышают размеры молекул фермента. Это значит, что молекулы ферментов могут проникать в складки рельефа поверхности макромолекул и передавать электроны более глубоко расположенным фенилпропановым звеньям,

вызывая разрыв внутренних связей, в результате чего от макромолекул могут отделяться не только мономеры, но и олигомеры, хотя вероятность отрыва олигомеров заметно меньше из-за их взаимодействия с ближайшим окружением посредством водородных связей.

**Таблица 1.** Размеры и молекулярные массы некоторых ферментов

Фермент	Параметры фермента		Ссылки
	Размер $d$ , нм	Молекулярная масса, Да	
Лигнинпероксидаза (LiP)	4.5–8.2	37000–76800	[37, 47, 66, 99]
Марганецпероксидаза (MnP)	4.6–5.3	39000	[109, 110]
Гибридная пероксидаза (VP)	7.5	37000	[81]
	5	34000	[67]
Лакказа	4.5–8.5	54000–56000	[57, 69, 82, 84, 98]
Пероксидаза хрена (HRP)	4	44000	[85]
	4–6.7	34500–69800	[35, 74, 88]
Цитохром-с-пероксидаза (CCP)	5–7.5	34000–34400	[39, 91]
Микропероксидаза	2	1900	[58]
Интрадиолдиоксигеназа	5	–	[119]
Гипоксантинфосфорибозилтрансфераза (HPRT)	1.32	–	[65]
Мальтозофосфатаза	3–4.5	–	[59]
Миоглобин	1.5	17000	[17]
Гемоглобин	3	64000	

## СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ ДЕСТРУКЦИИ ЛИГНИНА

Основные процессы, протекающие при распаде лигнина, представлены на рис. 6.

На начальном этапе действия лигнолитических ферментных систем грибов в лигнине увеличивается содержание карбонильных и карбоксильных групп и уменьшается содержание алифатических гидроксильных групп. Содержание фенольных гидроксидов может и возрастать, и понижаться.





**Рис. 6.** Процессы ферментативной деструкции лигнина.

В молекулах лигнина возрастает массовая доля кислорода и понижается содержание метоксильных групп за счет процесса деметилирования. Увеличение содержания кислорода происходит в результате окисления  $\alpha$ -углеродных атомов и окислительной деструкции связей между  $\beta$ - и  $\gamma$ -углеродными атомами пропановой цепи, а также за счет окислительного расщепления  $\beta$ -O-4 связей с концевыми фенилпропановыми единицами [6, 15, 60, 87].

Реакции расщепления связей  $\alpha$ -O-4,  $\beta$ -5,  $\beta$ -1 и  $\beta$ - $\beta$  приводят к получению моно- и олиголигнолов, большинство из которых содержат карбоксильные группы. В процесс деструкции макромолекул лигнина под действием ферментов вовлекаются перекись водорода и свободные радикалы. Перекисный механизм разложения лигнина приводит к последовательному хаотическому разрыву многочисленных эфирных связей и обеспечивает в конечном итоге наиболее глубокую фрагментацию макромолекул. Особенно интенсивно разрыв протекает в кислой среде для  $\alpha$ -эфирных связей, а в случае  $\beta$ -эфирных связей разрыв идет легко и в кислой, и в щелочной среде [9, 23, 24, 29].

Лигнин не всегда расщепляется полностью: некоторая его часть может превращаться в высококонденсированный продукт, так как с процессами деструкции конкурируют реакции полимеризации и поликонденсации [50]. Конденсированные лигнины, содержащие дифенильные связи, проявляют высокую устойчивость к действию ферментов грибов. В листовном лигнине и искусственном гваяцилсирингиальном лигнине сирингиальные элементы подвергаются деструкции быстрее, чем гваяцильные. Это объясняется большим содержанием в гваяцильной части лигнина дифенильных структур, у которых фенольные гидроксильные группы не склонны к образованию феноксильных радикалов [60, 87].

Распределение олиголигнолов по размеру зависит от структуры макромолекул и энергии связей. В случае дендроидной структуры макромолекулы, отделение от нее фрагмента любого размера потребовало бы разрыва только одной C-C или C-O связи, соединяющей фенилпропановые звенья (энергия разрыва около 80 ккал/моль). Тогда фактором, лимитирующим размеры отрываемых фрагментов, будет не количество разрываемых связей (в данном случае — только одна), а рельеф поверхности макромолекулы — размеры выступов и впадин, определяющие глубину проникновения молекул ферментов или радикалов-медиаторов в объем макромолекулы. Этот стерический фактор будет регулировать распределение олиголигнолов по размерам. Однако могут быть еще два дополнительных фактора, влияющих на распределение олиголигнолов. Один из них — редкая внутримолекулярная сшивка в макромолекулах лигнина, приводящая к образованию циклов, вовлекающих разное число мономеров. Отрыв фрагмента, входящего в состав цикла, требует разрыва двух связей с суммарной энергией около 160 ккал/моль, что экспоненциально уменьшает вероятность этого события. Если поперечная сшивка равномерно распределена по объему макромолеку-

лы, то чем крупнее фрагмент, тем в большем количестве циклов участвуют его элементы и тем больше связей надо разорвать. Другой фактор — водородные связи между фрагментами макромолекулы (с энергией  $5 \pm 3$  ккал/моль), которые хотя и значительно слабее С–С и С–О связей, но более многочисленны (в среднем — по три связи на каждое фенилпропановое звено) и их число увеличивается с ростом размера фрагмента, уменьшая вероятность отрыва более крупного фрагмента. Таким образом, указанные причины способствуют тому, что вероятность отрыва фрагмента уменьшается с ростом его размера. В результате в водной среде формируется убывающее распределение олиголигнолов по размерам.

Включение моно- и олиголигнолов во внутренний обмен веществ гриба возможно после расщепления ароматических колец. Разрыв ароматического кольца осуществляют диоксигеназы. При этом в субстрат включается молекулярный кислород. Разрыв происходит либо между двумя соседними гидроксильными группами (т.н. орто-расщепление), либо между гидроксильрованным углеродом и соседним негидроксильрованным (мета-расщепление).

Орто-расщепление приводит к образованию дикарбоновой кислоты. По-видимому, сначала происходит присоединение молекулы  $O_2$  к гидроксильным группам соседних атомов углерода с образованием циклической перекиси, а затем в результате внутримолекулярной перегруппировки межуглеродная связь разрывается и образуется цис,цис-муконовая кислота. Этот процесс протекает при участии диоксигеназы.

Мета-расщепление тоже катализируется диоксигеназами. Продукты расщепления в этом случае — полуальдегиды 2-гидроксимуконовой кислоты, которые затем превращаются (в зависимости от замещений) в пироват, ацетальдегид, гидроксоацетат, фумарат, ацетоацетат, сукцинат или иные промежуточные продукты, вовлекаемые в промежуточный метаболизм [28, 104].

Важно отметить, что время расщепления и минерализации низкомолекулярных продуктов распада лигнина намного меньше времени деструкции макромолекул лигнина.

Ферментативное расщепление ароматических колец возможно не только у мономерных продуктов деструкции, но и в лигнинном полимере. Однако осуществляется это с меньшей вероятностью, чем расщепление других, менее прочных, связей. При этом происходит разрыв арилэфирных связей и расщепление пропановых цепей [9, 28, 29, 87].

Распад лигнина сопровождается окислением и деструкцией боковых цепей, деметилированием, гидролизом, раскрытием ароматического кольца и декарбоксилированием [4, 12, 13, 26, 30]. Это приводит к образованию группы веществ с меньшей молекулярной массой, например ароматических кислот: феруловой, сиригильевой, циннамовой, ванилиновой, а также соответствующих альдегидов. В дополнение к ним образуются осколки в виде циклических соединений, преимущественно фенолов и катехинов. Далее идет превращение кислот

и альдегидов до соответствующих спиртов, которые при благоприятных условиях могут вновь присоединяться к макромолекулам лигнина. В случае деградации боковых цепей эти спирты превращаются в ванилин, сиреневый альдегид и *n*-оксибензальдегид. Эксперименты показывают, что помимо указанных веществ образуются также летучие одноатомные фенолы, многоатомные фенолы и их производные, карбоновые кислоты, метиловый спирт [50]. Дальнейшая деструкция протекает с изменением функциональных групп, раскрытием бензольного кольца и далее вплоть до полной минерализации соединений.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ. ЗАКОНОМЕРНОСТИ ДЕСТРУКЦИИ ЛИГНИНА

Анализ ферментативной деструкции лигнина позволяет выделить особенности процесса, важные для моделирования кинетики деструкции; они состоят в следующем:

1. Биодеструкция макромолекул лигнина — длительный процесс, протекающий с участием ферментных систем грибов в присутствии кислорода, необходимого для разрыва связей между фенилпропановыми звеньями макромолекулы.

2. Существуют два механизма действия фермента на макромолекулы лигнина: 1) механизм прямого действия путем переноса электрона из гемового кармана на поверхность глобулы по длинной цепи LRET; 2) механизм опосредованного действия через стабильные катионрадикальные частицы, образующиеся в результате действия фермента на низкомолекулярные диметоксифенильные медиаторы типа VA или 14DMB.

3. Кислород играет решающую роль в функционировании лигнинпероксидазы. При окислении LiP ароматических субстратов кислород отвечает за образование пероксирадикалов, которые могут затем вовлекать в цепные неферментативные реакции новые молекулы субстрата, значительно ускоряя его превращение. Но особенно важно присутствие кислорода для преодоления рекомбинации углеродных радикалов, образуемых при выбросе протона катионрадикалами — непосредственными продуктами LiP. Тем самым предотвращается обратная реакция сшивки радикалов, противодействующая распаду макромолекул.

4. Основные лигнинразрушающие ферменты (LiP, MnP, VP, лакказы) имеют молекулярную массу 37–77 кДа и размеры 4.5–8.5 нм.

5. Лигнинпероксидаза катализирует следующие реакции: расщепление C–C связей между фенилпропановыми звеньями, окисление бензиловых спиртов, расщепление эфирных связей, окисление метильных заместителей в бензильных соединениях, гидроксирование бензильных метильных групп, расщепление ароматического кольца, декарбоксилирование щавелевой кислоты, полимеризация фенолов.

6. Марганецпероксидаза может окислять лигнин в стационарном режиме только в присутствии ионов марганца в качестве редокс-медиаторов. Вместе с тем, MnP способна за-

пускать многочисленные неферментативные процессы, инициируемые комплексами  $Mn^{3+}$  или вторичными медиаторами.  $MnP$  служит мощным внеклеточным агентом опосредованного воздействия на лигнин. Она обладает способностью обеспечивать себя перекисью в результате каскада сопряженных неферментативных реакций восстановления кислорода.

7. Лакказы и гибридные пероксидазы отличаются широкой специфичностью. Лакказы проявляют активность в широком интервале значений рН.

8. Наличие разных типов пероксидаз в ферментной системе одного и того же гриба-деструктора лигнина позволяет ему адаптироваться к разным условиям функционирования, в том числе к широкому варьированию рН и концентрации эндогенного пероксида, обеспечивая непрерывающееся разложение лигнина в самых разных условиях. Устойчивость процессу деструкции лигнина придает разнообразие сосуществующих видов грибов-деструкторов с отличающимися ферментными системами, высокая адаптивность грибов к условиям среды и имеющемуся субстрату, осуществляемая путем надлежащего изменения (настройки) качественного и количественного состава синтезируемого комплекса ферментов.

9. На начальном этапе действия ферментных систем грибов белой гнили в лигнине увеличивается содержание карбонильных и карбоксильных групп и уменьшается содержание алифатических гидроксильных групп. Содержание фенольных гидроксидов может и возрастать, и понижаться. В молекулах лигнина возрастает массовая доля кислорода и понижается содержание метоксильных групп за счет процесса деметилирования.

10. Перекисный механизм разложения лигнина приводит к хаотическому разрыву многочисленных эфирных связей и обеспечивает наиболее глубокую фрагментацию макромолекул. Реакции расщепления связей  $\alpha-O-4$ ,  $\beta-5$ ,  $\beta-1$  и  $\beta-\beta$  приводят к получению моно- и олиголигнолов.

11. Вероятность отрыва фрагмента уменьшается с ростом его размера. В результате в водной среде формируется убывающее распределение олиголигнолов по размерам.

12. В процессе биодеструкции лигнина образуются ароматические соединения, которые подвергаются дальнейшему расщеплению. Разрыв ароматического кольца осуществляют диоксигеназы. При этом в субстрат включается молекулярный кислород. Разрыв происходит либо между двумя соседними гидроксильными группами (орто-расщепление), либо между гидроксильрованным углеродом и соседним негидроксильрованным (мета-расщепление).

13. Ферментативное расщепление ароматических колец в присутствии кислорода возможно не только у мономерных продуктов деструкции, но и в лигнинном полимере. Однако осуществляется это с меньшей вероятностью, чем расщепление других, менее прочных, связей.

14. В анаэробных условиях макромолекулы лигнина практически не вовлекаются в метаболизм в отличие от олигомерных продуктов его разложения, которые могут метаболизироваться бактериями-анаэробами, атакующими фенолы в процессах денитрификации, сульфидогенеза, метаногенеза.

15. Лигнин не всегда расщепляется полностью: некоторая его часть может превращаться в высококонденсированный продукт, так как с процессами деструкции конкурируют реакции полимеризации и поликонденсации. Конденсированные лигнины, содержащие дифенильные связи, проявляют высокую устойчивость к действию ферментов грибов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александрова Г.П., Медведева С.А., Бабкин В.А., Соловьев В.А., Малышева О.И. Иванова С.З. Влияние состава питательной среды на лигниназную активность базидиомицета *Phanerochaete chrysosporium* // Химия древесины. 1989. № 6. С. 77-80.
2. Антропова О.Н., Билай В.И., Войцеховский Р.В. Исследование разложения лигнина микромицетами // Химия и использование лигнина. Рига, 1974. 182 с.
3. Беккер З.Э. Физиология и биохимия грибов. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1988. 230 с.
4. Богомоллов Б.Д. Химия древесины и основы химии высокомолекулярных соединений. М., 1973. 400 с.
5. Болобова А.В., Аскадский А. А., Кондращенко В. И., Рабинович М. Л. Теоретические основы биотехнологии древесных композитов // Кн. 2: Ферменты, модели, процессы. М.: Наука, 2002. 344 с.
6. Браунс Ф.Э., Браунс Д.С. Химия лигнина. М.: Лесная промышленность, 1964. 863 с.
7. Денисова Н.П. Протеолитические ферменты базидиальных грибов, таксономические и экологические аспекты их изучения. Дисс. ... докт. биол. наук. Л.: Ботанический ин-т РАН, 1991. 402 с.
8. Елинов Н.П. Химическая микробиология. М.: Высш. шк., 1989. 448 с.
9. Заварзин Г.А. Лекции по природоведческой микробиологии. М.: Наука, 2003. 348 с.
10. Иванов В. И. Как работают ферменты // Соросовский образовательный журнал. 1996. № 9. С. 25-32.
11. Клячко Н. Л. Ферменты – биологические катализаторы: основные принципы действия // Соросовский образовательный журнал. 1997. № 3. С. 58-63.
12. Кононов Г. Н. Химия древесины и ее основных компонентов. М., 1999. 247 с.
13. Криульков В. А., Каплин В. Т., Ганин Г. И. Механизм превращения лигнина и его производных в природной воде // Химия и использование лигнина. Рига, 1974. 182 с.

14. Леонтьевский А. А. Лигниназы базидиомицетов. Дисс. ... докт. биол. наук. Пушкино: Ин-т микробиологии и физиологии микроорганизмов РАН, 2002. 266 с.
15. Манская С. М. Биосинтез и распад лигнина // Успехи современной биологии. 1957. Т. XLIV. Вып. 1(4). С. 19-36.
16. Медведева С. А., Бабкин В. А. Пути деструкции фенольных соединений и лигнина грибами белой гнили // Превращение древесины при энзимат. и микробиол. воздействиях: Тез. докл. 3 научн. сем. Рига, 1988. С. 85-92.
17. Межиковский С. М., Иржак В. И. Химическая физика отверждения олигомеров. М.: Наука, 2008. 269 с.
18. Научные основы устойчивости лесов к дереворазрушающим грибам. М.: Наука, 1992. 222 с.
19. Никитин Н. И. Химия древесины. М.: Изд-во Акад. наук СССР, 1951. 578 с.
20. Покаржевский А. Д. Геохимическая экология наземных животных. М.: Наука, 1985. 250 с.
21. Рабинович М. Л., Болобова А. В., Кондращенко В. И. Теоретические основы биотехнологии древесных композитов // Кн. 1: Древесина и разрушающие ее грибы. М.: Наука, 2001. 264 с.
22. Рабинович М. Л., Болобова А. В., Васильченко Л. Г. Разложение природных ароматических структур и ксенобиотиков грибами (обзор) // Прикл. биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. № 1. С. 5-23.
23. Резников В. М., Чирич Л. В., Якубовский С. Ф. Нуклеофильное замещение у  $\alpha$ -углеродного атома гваяцилглицериновых структурных единиц лигнина // Химия и использование лигнина. Рига, 1974. 182 с.
24. Резников В. М. Реакционная способность лигнина и его превращение в процессах делигнификации древесины // Химия древесины. 1977. № 3. С. 3-23.
25. Тимофеева С. С., Бейм А. М. Закономерности трансформации лигнинных веществ в воде водоемов Восточной Сибири // Водн. ресурсы. 1990. № 2. С. 115-120.
26. Фенгель Д., Вегенер Г. Древесина: химия, ультраструктура, реакции. М.: Лесн. пром-сть, 1988. 512 с.
27. Шеховцова Т. Н. Ферменты: их использование в химическом анализе // Соросовский образовательный журнал. 2000. Т. 6. №1. С. 44-48
28. Шлегель Г. Общая микробиология. М.: Мир, 1987. 567с.
29. Шорыгина Н. Н., Резников В. М., Елкин В. В. Реакционная способность лигнина. М.: Наука, 1976. 368 с.

30. Adler E. Lignin Chemistry – past, present and future // Wood Sci. Technol. 1977. V. 11. № 3. P. 169-218.
31. Aitken M. D., Irvine R. L. Characterization of reactions catalyzed by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* // Arch. Biochem. Biophys. 1990. V. 276. P. 405-414.
32. Andersson L. A., Renganathan V., Loehr T. M., Gold M. H. Lignin peroxidase: resonance Raman spectral evidence for compound II and for a temperature-dependent coordination-state equilibrium in the ferric enzyme // Biochemistry. 1987. V. 26. № 8. P. 2258-2263.
33. Banci L, Ciofi-Baffoni S., Tien M. Lignin and Mn peroxidase-catalyzed oxidation of phenolic lignin oligomers // Biochemistry. 1999. V. 38. № 10. P. 3205-3210.
34. Beratan D. N., Onuchic J. N., Winkler J. R., Gray H. D. Electron-tunneling pathways in proteins // Science. 1992. V. 258. P. 1440-1471.
35. Berglund G. I., Carlsson G. H., Smith A. T., Szoke H., Henriksen A., Hajdu J. The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution // Nature. 2002. V. 417. P. 463-468.
36. Bhadra B., Raghukumar C., Pindi P. K., Shivaji S. *Brevibacterium oceanic* sp. nov., isolated from deep-sea sediment of the Chagos Trench, Indian Ocean International // J. Systematic and Evolutionary Microbiology. 2008. V. 58. P. 57-60.
37. Blodig W., Smith A. T., Doyle W. A., Piontek K. Crystal structures of pristine and oxidatively processed lignin peroxidase expressed in *Escherichia coli* and of the W171F variant that eliminates the redox active tryptophan 171. Implications for the reaction mechanism // J. Mol. Biol. 2001. V. 305. P. 851-861.
38. Böckle B., Martínez M. J., Guillén F., Martínez A. T. Mechanism of peroxidase inactivation in liquid cultures of the ligninolytic fungus *Pleurotus pulmonarius* // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. № 3. P. 923-928.
39. Bonagura C. A., Bhaskar B., Sundaramoorthy M., Poulos T. L. Conversion of an engineered potassium-binding site into a calcium-selective site in cytochrome c peroxidase // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 37827-37833.
40. Boominathan K., Balachandra Dass S., Randall T. A., Kelly R. L., Reddy C. A. Lignin peroxidase-negative mutant of the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* // J. Bacteriol. 1990. № 1. P. 260-265.
41. Boominadthan K., Reddy C. Fungal degradation of lignin: biotechnological applications // In: Arara D. K, Elander R. P., Mukrerji K. G. (ed). Handbook of Applied Mycology. Biotechnology, Marcel Dekker, New York. VAP, 1992. P. 763-822.
42. Broda P. Models of microbial attack on lignin // Biodeteriorat. 7 Select. Pap. 7-th Int. Biodeteriorat. Symp., Cambridge, 6-11 Sept.1987, London, New York, 1988. P. 347-350.



43. Camarero S., Sarkar S., Ruiz-Duenas F. J. et al. Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 10324-10330.
44. Camarero S., Ruiz-Duenas F. J., Sarkar S., et al. The cloning of a new peroxidase found in lignocellulose cultures of *Pleurotus eryngii* and sequence comparison with other fungal peroxidases // *FEMS Microbiol. Lett.* 2000. V. 191. № 1. P. 37-43.
45. Carlson D. J., Mayer L.M., Brann M. L., Mague T. H. Binding of monomeric organic compounds to macro-molecular dissolved organic matter in seawater // *Mar. Chem.* 1985. V. 16. P. 141–153.
46. Chance B. The kinetics and stoichiometry of the transition from the primary to the secondary peroxidase peroxide complexes // *Arch. Biochem. Biophys.* 1952. V. 41. P. 416-424.
47. Choinowski T., Blodig W., Winterhalter K. H., Piontek K. The crystal structure of lignin peroxidase at 1.70 Å resolution reveals a hydroxy group on the c beta of tryptophan 171: a novel radical site formed during the redox cycle // *J. Mol. Biol.* 1999. V. 286. P. 809-827.
48. Collins P. J., O'Brien M. M., Dobson A. D. W. Cloning and characterization of a cDNA encoding a novel extracellular peroxidase from *Trametes versicolor* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1999. V. 65. P. 1343-1347.
49. Creighton T. E. *Proteins: Structure and Molecular Properties*. New York: W.H. Freeman, 1993. 507 p.
50. Dalimova G. N., Akhmedova Z. R. Biodestruction of lignins by the basidiomycete *Pleurotus ostreatus* // *Chemistry of Natural Compounds*. 2001. V. 37. № 1. P. 83-85.
51. Damare S., Raghukumar C., Raghukumar S. Fungi in deep-sea sediments of the Central Indian Basin // *Deep-Sea Research I*. 2006. V. 53. P. 14–27.
52. Damare S., Raghukumar C., Muraleedharan U., Raghukumar S. Deep-sea fungi as a source of alkaline and cold-tolerant proteases // *Enzyme and Microbial Technology*. 2006. V. 39. № 2. P. 172-181.
53. De Pillis G. D., Wariishi H., Gold M. H., Ortis de Montellano P. R. Inactivation of lignin peroxidase by phenylhydrazine and sodium azide // *Arch. Biochem. Biophys.* 1990. V. 280. № 1. P. 217-223.
54. De Souza D. T., Tiwari R., Sah A. K., Raghukumar C. Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes // *Enzyme and Microbial Technology*. 2006. V. 38. № 3-4. P. 504–511.
55. Domsch K. H., Gams W., Anderson T-H. *Compendium of Soil Fungi*. Academic Press, London, 1980.

56. Du P., Loew G. H. Molecular dynamics simulation of lignin peroxidase complexes for the substrate binding // Plant peroxidases. Biochemistry and physiology. III Intern. Symposium. Ed. Welender K.G. et al., University of Copenhagen and University of Geneva. 1993. P. 27-30.
57. Ducros V., Brzozowski A. M., Wilson K. S., Ostergaard P., Schneider P., Svendsen A., Davies G. J. Structure of the laccase from *Coprinus cinereus* at 1.68 Å resolution: evidence for different 'type 2 Cu-depleted' isoforms // Acta Crystallogr., Sect. D. 2001. V. 57. P. 333-336.
58. Dvorák M., Trávník P. Uptake of microperoxidase by segmenting rat ova in vitro // Histochemistry and Cell Biology. 1976. V. 47. № 3. P. 257-262.
59. Egloff M.-P., Uppenberg J., Haalch L., van Tilbeurgh H. Crystal structure of maltose phosphorylase from *Lactobacillus brevis*: unexpected evolutionary relationship with glucoamilases // Structure. 2001. V. 9. P. 689-697.
60. Eriksson K.-E. L., Blanchette R. A., Ander P. Microbial and Enzymatic Degradation of Wood Components. Berlin: Springer-Verlag, 1990. 398 p.
61. Evans C. S. Lignin degradation // Progress Biochemistry. 1987. V. 22. № 4. P. 102-105.
62. Fischer J. P., Ferdelman T. G., Hondt S. D., Røy H., Wenzhöfer F. Oxygen penetration deep into the sediment of the South Pacific gyre // Biogeosciences Discuss. 2009. V. 6. P. 3159–3186.
63. Flaig W. Effects of microorganisms in the transformation of lignin to humic substances // Geohim. Cosmochim. Acta. 1964. V. 28. P. 1523-1535.
64. Forney L. Y., Reddy C. A., Tien M., Aust S. D. The involvement of hydroxyl radical derived from hydrogen peroxide on lignin degradation by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. P. 11455-11462.
65. Freymann D. M., Wenck M. A., Engel J. C., Feng J., Focia P. J., Eakin A. E., Craig S. P. Efficient identification of inhibitors targeting the closed active site conformation of the HPRT from *Trypanosoma cruzi* // Chemistry and Biology. 2000. № 7. P. 957-968.
66. Fukuyama K., Okada T. Structures of cyanide, nitric oxide and hydroxylamine complexes of *Arthromyces ramosus* peroxidase at 100 K refined to 1.3 Å resolution: coordination geometries of the ligands to the haem iron // Acta Crystallogr., Sect. D. 2007. V. 63. P.472-477.
67. Gerardino A., Notargiacomo A., Morales P. Laser assisted deposition of nanopatterned biomolecular layers // Microelectronic Engineering. Proceedings of the 28th International Conference on Micro- and Nano-Engineering. 2003. V. 67-68. P. 923-929.
68. Gold M., Wariishi H., Mayfield M. B., Kishi K. Recent studies on lignin and manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* // Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology. Ed. Welender et al. University of Geneva. 1993. P. 87-95.

69. Hakulinen N., Kiiskinen L. L., Kruus K., Saloheimo M., Paananen A., Koivula A., Rouvinen J. Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site // Nat. Struct. Biol. 2002. V. 9. P. 601-605.
70. Harvey P. J., Palmer J. M. Oxidation of compound by ligninase // J. Biotechnol. 1990. V. 13. № 2-3. P. 169-179.
71. Hatakka A. Ligninolytic enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation // FEMS Microbiol. Rev. 1994. V. 13. P. 125-135.
72. Heinfling A., Martínez M. J., Martínez A. T. et al. Purification and characterization of peroxidases from the dye-decolorizing fungus *Bjerkandera adusta* // FEMS Microbiol. Rev. 1998. V. 165. P. 43-50.
73. Heinfling A., Ruiz-Duenas F. J., Martínez M. J. et al. A study on reducing substrates of manganese-oxidizing peroxidases from *Pleurotus eryngii* and *Bjerkandera adusta* // FEBS Lett. 1998. V. 428. P. 141-146.
74. Henriksen A., Smith A. T., Gajhede M. The structures of the horseradish peroxidase C-ferulic acid complex and the ternary complex with cyanide suggest how peroxidases oxidize small phenolic substrates // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 35005-35011.
75. Hyde S. M., Wood P. M. A mechanism for production of hydroxyl radicals by the brown-rot fungus *Coniophora puteana*: Fe (III) reduction by cellobiose dehydrogenase and Fe (II) oxidation at a distance from the hyphae // Microbiology. 1997. V. 143. P. 259-266.
76. Keil R. G., Kirchman D. L. Abiotic transformation of labile protein to refractory protein in sea water // Marine Chem. 1994. V. 45. P. 187-196.
77. Kimura Y., Asada Y., Kuwahara M. Screening of basidiomycetes for lignin peroxidase genes using a DNA probe // Appl. Microbiol. and Biotechnol. 1990. V.32. № 4. P.436-442.
78. Kirk T. K., Farrell R. L. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin // Ann. Rev. Microbiol. 1987. V. 41. P. 465-505.
79. Kohlmeyer J., Kohlmeyer E. Marine Mycology. The higher fungi. Academic Press, New York, 1979.
80. Kuila D., Tien M., Fee J. A., Ondrias M. R. Resonance Raman spectra of extracellular ligninase: evidence for a heme active site similar to those of peroxidases // Biochemistry. 1985. V. 24. P. 3394-3397.
81. Kunishima N., Fukuyama K., Matsubara H., Hatanaka H., Shibano Y., Amachi T. Crystal structure of the fungal peroxidase from *Arthromyces ramosus* at 1.9 Å resolution. Structural comparisons with the lignin and cytochrome c peroxidases // J. Mol. Biol. 1994. V. 235. P. 331-344.

82. Li X. Wei, Z. Zhang, M. Peng, X. Yu, G. Teng, M. Gong. Crystal structures of *E. coli* laccase CueO at different copper concentrations // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. V. 354. P. 21-26.
83. Lorenz R., Molitoris H.P. High-pressure cultivation of marine fungi: cultivation experiments // In: Balny C., Hayashi R., Masson, P. (Eds.). *High pressure and biotechnology.* John Libbey & Co., London, 1992. P. 315-319.
84. Lyashenko A. V., Zhukhlistova N. E., Gabdoulkhakov A. G., Zaitsev V. N., Bento I., Lamzin V. S., Betzel C., Lindley P. F., Koroleva O. V., Zhukova Y. N., Stepanova E. V., Morgunova E.Y., Voelter W., Schirwitz K., Tishkov V. I., Kachalova G. S., Cherkashyn E. A., Mikhailov A. M. Purification, crystallization and preliminary X-ray study of the fungal laccase from *Cerrena maxima* // *Acta Crystallogr., Sect. F.* 2006. V. 62. P. 954-957.
85. Maehly A. Plant peroxidase, in *methods in enzymology.* V.II. Academic Press. NY, 1955.
86. Martinez A.T. Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases // *Enzyme and Microbial Technology.* 2002. V. 30. P. 425-444.
87. Medvedeva S. A., Kanitskaya L. V., Volchatova I. V., Turchaninov V. K. Biotransformation of Aspen lignin by the fungus *Trametes villosus* // *Chemistry of Natural Compounds.* 2000. V. 36. №. 4. P. 411-415.
88. Meno K., Jennings S., Smith A. T., Henriksen A., Gajhede M. Structural analysis of the two horseradish peroxidase catalytic residue variants H42E and R38S/H42E: implications for the catalytic cycle // *Acta Crystallogr., Sect. D.* 2002. V. 58. P. 1803-1812.
89. Mester T., Field J. A. Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera* species strain BOSS55 in the absence of manganese // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 15412-15417.
90. Mester T., Tien M. Engineering of a manganese-binding site in lignin peroxidase isozyme H8 from *Phanerochaete chrysosporium* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001. V. 284. № 3. P. 723-728.
91. Metcalfe C. L., Macdonald I. K., Murphy E. J., Brown K. A., Raven E. L., Moody P. C. E. The *Tuberculosis Prodrug* Isoniazid Bound to Activating Peroxidases // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. P. 6193.
92. Moredo N., Lorenzo M., Dominguez A., Moldes D., Cameselle C., Sanroman A. Enhanced ligninolytic enzyme production and degrading capability of *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor.* // *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* 2003. V. 19. P. 665-669.
93. Moser C. C., Keske J. M., Warncke K. et al. Nature of biological electron transfer // *Nature (London).* 1992. V. 355. № 6362. P. 796-802.

94. Nguyen R., Harvey H. R. Preservation of protein in marine systems: Hydrophobic and other noncovalent associations as major stabilizing forces // *Geochim. Cosmochim. Acta*. 2001. V. 65. P. 1467–1480.
95. Ogawa H., Tanoue E. Dissolved Organic Matter in Oceanic Waters // *J. Oceanography*. 2003. V. 59. P. 129–147.
96. Pantoja S., Lee C. Molecular weight distribution of proteinaceous material in Long Island Sound sediments // *Limnol. Oceanogr.* 1999. V. 44. P. 1323–1330.
97. Palmieri G., Giardina P., Zocchi I., Sannia G. Manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus ostreatus* // In: Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. Canadian Pulp and Paper Association, Montreal, 1998. P. B253-B256.
98. Piontek K., Antorini M., Choinowski T. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 37663-37669.
99. Poulos T. L., Edwards S. L., Wariishi H., Gold M. H. Crystallographic refinement of lignin peroxidase at 2 Å // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 4429-4440.
100. Raghukumar C., Raghukumar S., Sharma S., Chandramohan D. Endolithic fungi from deep-sea calcareous substrata: isolation and laboratory studies // In: Desai B.N. (Ed.). *Oceanography of the Indian Ocean*. Oxford IBH Publ., New Delhi, 1992.
101. Raghukumar C., Raghukumar S., Sheelu G., Gupta S. M., Nath B. N., Rao B. R. Buried in time: culturable fungi in a deep-sea sediment core from the Chagos Trench, Indian Ocean // *Deep-Sea Research I*. 2004. V. 51. P. 1759-1768
102. Roth F.J., Orpurt P.A., Ahearn D.J. Occurrence and distribution of fungi in a subtropical marine environment // *Canadian Journal of Botany*. 1964. V. 42. P. 375-383.
103. Ruiz-Dueñas F.J., Martínez M.J., Martínez A.T. Heterologous expression of *Pleurotus eryngii* peroxidase confirms its ability to oxidize Mn<sup>2+</sup> and different aromatic substrates // *Appl. Environ. Microbiol.* 1999. V. 65. P. 4705-4707.
104. Schink B., Philipp B., Muller J. Anaerobic degradation of phenolic compounds // *Naturwissenschaften*. 2000. V. 87. P. 12-23.
105. Schoemaker H. E., Lundell T. K., Floris R. et al. Do carbohydrates play a role in the lignin peroxidase cycle? Redox catalysis in the endergonic region of the driving force // *Bioorg. Med. Chem.* 1994. V. 2. № 6. P.509-519.
106. Sheng D., Gold M. H. Irreversible oxidation of ferricytochrome *c* by lignin peroxidase // *Biochemistry*. 1998. V. 37. № 7. P. 2029-2036.

107. Sheng D., Gold M. H. Oxidative polymerization of ribonuclease A by lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. Role of veratryl alcohol in polymer oxidation // Eur. J. Biochem. 1999. V. 259. № 3. P. 626-634.
108. Stoychev I., Homolka L., Nerud F., Lis L. Activities of ligninolytic enzymes in some white-rot basidiomycete strains after recovering from cryopreservation in liquid nitrogen // Antonie van Leeuwenhoek. 1998. V. 73. P. 211-214.
109. Sundaramoorthy M., Kishi K., Gold M. H., Poulos T. L. Preliminary crystallographic analysis of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* // J. Mol. Biol. 1994. V. 238. P. 845-848.
110. Sundaramoorthy M., Youngs H. L., Gold M. H., Poulos T. L. High-Resolution Crystal Structure of Manganese Peroxidase: Substrate and Inhibitor Complexes // Biochemistry 2005. V. 44. P. 6463-6470.
111. Takami H., Inoue A., Fuji F., Horikoshi K. Microbial flora in the deepest sea mud of the Mariana Trench // FEMS Microbiology Letters. 1997. V. 152. P. 279-285.
112. Takami H. Isolation and characterization of microorganisms from deepsea mud // In: Horikoshi K., Tsujii K. (Eds.). Extremophiles in deep-sea environments. Springer-Verlag, Tokyo, 1999. P. 3-26.
113. Tonon F., Prior de Castro C, Odier E. Nitrogen and carbon regulation of lignin peroxidase and enzymes of nitrogen metabolism in *Phanerochaete chrysosporium* // Exp. Mycol. 1990. № 14. P. 243-254.
114. Tuor U., Winterhalter K., Fiechter A. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determination for wood decay // J. Biotechnology. 1995. V. 41. P. 1-17
115. Turner R. D. Wood-boring bivalves, opportunistic species in the deep-sea // Science. 1973. V. 180. P. 1377-1379.
116. Umezawa T., Higuchi T. Cleavages of aromatic ring and side Chain of a (-O-4) lignin substructure model trimer by lignin peroxidase // Mokuzai Gakkaishi. 1988. V. 34. № 11. P. 929-933.
117. Urzua U., Larrondo L. F., Lobod S. et al. Oxidation reactions catalyzed by manganese peroxidase isoenzymes from *Ceriporiopsis subvermispota* // FEBS Lett. 1995. V. 371. P. 132-136.
118. Van der Woude M., Boominathan K., Reddy C. Nitrogen regulation of lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase production in independent of carbon and manganese regulation in *Phanerochaete chrysosporium* // Arch. Microbiol. 1993. V. 160. № 1. P. 1-4.
119. Vetting M. W., Ohlendorf D. H. The 1.8 Å crystal structure of catechol-1,2-dioxygenase reveals a novel hydrophobic helical zipper as a subunit linker // Structure. 2000. № 8. P. 429-440.

120. Waldner R., Leisola M. S. A, Fiechter Armin. Comparison of ligninolytic activities of selected white-rot fungi // *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* 1988. V. 29. № 4. P. 400-407.
121. Wariishi H., Akileswaran L., Gold M. H. *Phanerochaete chrysosporium*: spectral characterization of the oxidized states and the catalytic cycle // *Biochemistry.* 1988. V. 27. P. 5365-5370.
122. Wariishi H., Dunford H. B., Mac Donald D. I., Gold M. H. Manganese peroxidase from the lignin degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Transient state kinetics and reaction mechanism // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. P. 3335-3340.
123. Wariishi H., Valli K., Renganathan V., Gold M. H. Thiol-mediated oxidation of nonphenolic lignin model compounds by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. № 24. P. 14185-14191.
124. Wariishi H., Gold M.H. Lignin peroxidase compound III. Mechanism of formation and decomposition // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. № 4. P. 2070-2077.
125. Wariishi H., Dunford H., Gold M. Reaction of lignin peroxidase from compounds land II with veratryl alcohol // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. P. 20694-20699.
126. Wariishi H., Sheng D., Gold M. H. Oxidation of ferrocycochrome *c* by lignin peroxidase // *Biochemistry.* 1994. V. 33. № 18. P. 5545-5552.
127. Yoshihara K., Umezawa T., Higuchi T., Nishiyama M. Degradation of non-phenolic -O-4 lignin structure model compound by *Coriolus hirsutus* // *Agricul. Biol. Chem.* 1988. V. 52. № 9. P. 2345-2346.
128. Zaunstöck B., Molitoris H.P. Germination of fungal spores under deep-sea conditions // *Abstr. VI International Marine Mycology Symposium. Portsmouth, 1995.*