



УДК(547.992.3 + 547.636.5 + 547.568.1) : 557.152.193.02

## МОДЕЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ЛИГНИНАЗЫ. ЧЕМ ОТЛИЧАЕТСЯ ЛИГНИНАЗА ОТ ДРУГИХ ПЕРОКСИДАЗ?

Шкроб А. М., Левит М. Н. \*, Арчаков А. И. \*\*

Научно-исследовательский институт физико-химической медицины  
Министерства здравоохранения РСФСР, Москва;

\* Институт химической физики Академии наук СССР, Москва;

\*\* 2-й Государственный медицинский институт им. Н. И. Пирогова, Москва

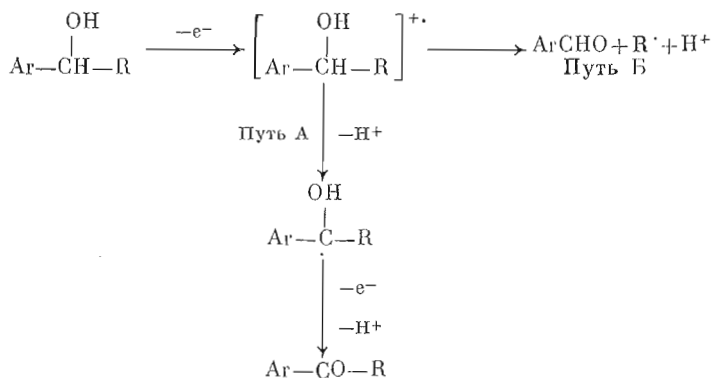
С целью определить, каким особенностям механизма действия лигниназы (лигнин-пероксидазы) из *Phanerochaete chrysosporium* обязана своей лигнинолитической активностью, исследовано окисление лигниноподобных соединений перекисью водорода, катализируемое пероксидазой из хрена. Обнаружено, что эта пероксидаза при  $\text{pH} \leq 5,5$  подобно лигниназе окисляет 3,4-диметоксигидробензоин с образованием вератрового и бензойного альдегидов. Со значительно меньшей скоростью вератровый альдегид образуется при окислении в этих условиях вератрилового спирта и 1-(3,4-диметоксифенил)-1,2-пропандиола. Последние два соединения, а также изомерные диметоксибензолы ускоряют окисление 3,4-диметоксигидробензоина, функционируя в качестве переносчика электрона между субстратом и ферментом.

Спонтанные превращения тех катион-радикалов, которые первично образуются из лигниноподобных соединений при их окислении пероксидазами, изучены в отсутствие ферментов как в водном растворе, так и в среде безводного ацетонитрила с применением анион-радикалов  $\text{SO}_4^{\cdot -}$  в качестве одноэлектронного окислителя. Предполагается, что гидролитическое деметилирование первичных катион-радикалов конкурирует с вторичным одноэлектронным окислением и/или с разрывом C—C-связи как при персульфатном окислении метоксилсодержащих лигниноподобных соединений в водной среде, так и при действии на них  $\text{H}_2\text{O}_2$  в присутствии пероксидазы из хрена. В активном же центре лигниназы первичные катион-радикалы, по-видимому, изолированы от воды на время, достаточное для их фрагментации и вторичного окисления.

Базидиомицет *Phanerochaete chrysosporium* выделяет в окружающую среду лигниназу (лигнинпероксидазу) — смесь близких по строению гемопroteinов, катализирующих окислительное расщепление лигнина и его синтетических моделей (обычно соединений, содержащих 3,4-диметоксифенилгидроксиметильный остаток) перекисью водорода [1, 2] (см. обзоры [3, 4]). Установлено, что эти реакции начинаются с переноса электро-

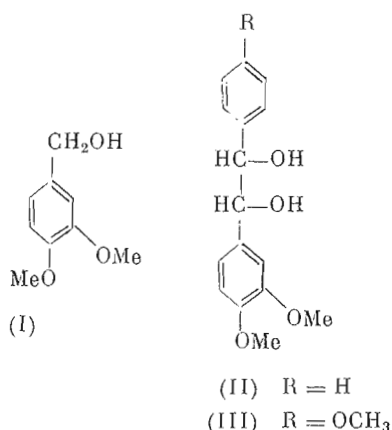
Схема 1

Превращения катион-радикалов, образующихся при одноэлектронном окислении бензиловых спиртов



$\text{R}=\text{H}$ , Alk, Alk(Ar) $\text{CH}_2$ , Alk(Ar)CHOH

на от субстрата к окисленному гему фермента, т. е. с образования катион-радикалов [3, 5—8]. Такие катион-радикалы либо отщепляют протон и подвергаются повторному одноэлектронному окислению, либо распадаются на фрагменты с разрывом C—C-связи (см. пути А и Б на схеме 1). Один из этих фрагментов представляет собой катион, теряющий далее протон, а другой — радикал, который окисляется ферментом или атмосферным кислородом. Так, например, вератриловый спирт (I) окисляется лигниназой до вератрового альдегида (путь А) [1, 9], тогда как 3,4-диметоксигидробензоин (II) претерпевает окислительное расщепление с образованием вератрового и бензойного альдегидов (путь Б) [7]. Выбор между этими путями определяется устойчивостью первичных катион-радикалов:



Таким образом, независимо от судьбы образующихся катион-радикалов на первом этапе окисления лигниназа функционирует подобно любой пероксидазе. Это сходство подчеркивается близостью спектральных свойств окисленных форм лигниназы и других гемсодержащих пероксидаз [10—12]. Естествен вопрос: чем же отличается лигниназа от этих пероксидаз?

Чтобы ответить на этот вопрос, мы избрали объектом исследования легко доступный и хорошо изученный фермент — пероксидазу из хрена (КФ 1.11.1.7). Поскольку активность лигниназы возрастает с уменьшением pH [1, 2, 7, 9], прежде всего было необходимо установить, приобретает ли пероксидаза из хрена лигнинолитические свойства в кислых средах.

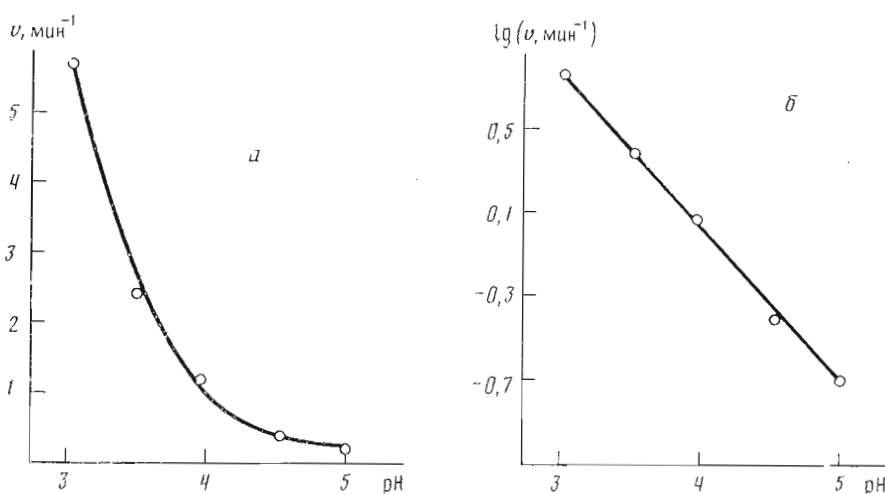


Рис. 1. pH-Зависимость начальной скорости образования вератрового альдегида (а) и ее полулогарифмическая анаморфоза (б) при окислении 3,4,4'-триметоксигидробензоина (III) перекисью водорода в присутствии пероксидазы из хрена (скорость выражена в числе оборотов фермента; 100 mM Na-цитратный буфер, 1 M NaCl, 0,5 mM субстрат, 200 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 5,3 мкМ фермент, 25° С). Наклон анаморфозы  $-0,78 \pm 0,02$

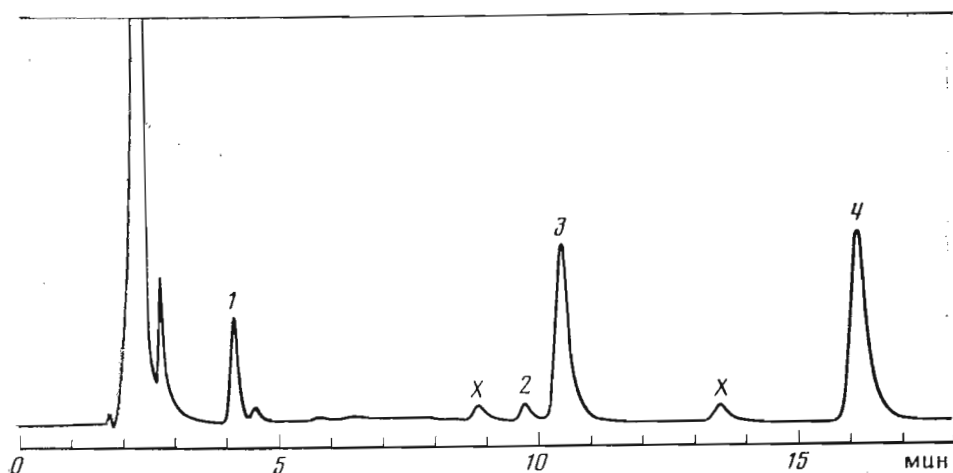


Рис. 2. Идентификация в виде О-метилоксимов вератрового и бензойного альдегидов, образовавшихся при пероксидазном окислении *эритро*-3,4-диметоксигидробензоина (II) (100 мМ Na-цитратный буфер, pH 3,5, 0,5 мМ субстрат, 200 мкМ  $H_2O_2$ , 5,3 мкМ фермент, 1 мМ 1,4-диметоксibenзол, 25° С, время инкубации 1 ч). Реакционную смесь дважды экстрагировали эфиром, экстракт упаривали и раствор остатка в 70% водном метаноле обрабатывали 10 мин при pH 8 (60° С) О-метилгидроксиламином (10 мМ). ВЭЖХ: колонка Zorbax C-8 (4,6 × 250 мм), элюент — метанол — вода (3 : 2), мониторинговая длина волны 250 нм. Пики: 1 — диметоксигидробензоин, 2 — диметоксibenзол, 3 — О-метилоксим вератрового альдегида, 4 — О-метилоксим бензальдегида (пики X нет в отсутствие О-метилгидроксиламина)

Тестовыми соединениями служили 3,4-диметоксигидробензоин (II), окислительное расщепление которого лигниназой протекает без образования побочных продуктов [7], а также его 4'-метоксипроизводное (III).

В обычных условиях ( $6 \leq \text{pH} \leq 8$ ;  $0,1 \text{ мМ} \leq [H_2O_2] \leq 5 \text{ мМ}$ ) пероксидаза неспособна расщеплять эти субстраты. Их окислительное расщепление, однако, наблюдается при  $\text{pH} \leq 5,5$ , причем скорость образования вератрового альдегида, регистрируемого спектрофотометрически по увеличению поглощения при 308 нм, монотонно возрастает с уменьшением pH (рис. 1). Судя по имеющимся данным, вератровый и бензойный (соответственно анисовый) альдегиды, идентифицированные спектрально и хроматографически (рис. 2), являются единственными продуктами реакции и образуются с одинаковыми скоростями. Начальная скорость образования вератрового альдегида удовлетворительно описывается уравнением Михаэлиса — Ментен, параметры которого довольно близки при окислении *эритро*- и *трео*-изомеров соединения (II) и *трео*-изомера соединения (III) (рис. 3).

Катализируемое пероксидазой окислительное расщепление соединений (II) и (III) не подавляется маннитом (50 мМ), диметилсульфоксидом (50 мМ) и супероксиддисмутазой (20 ед. акт./мл, pH 5), но ингибируется цианидом (на 30%, 1 мМ) и азидом (полностью, 1 мМ). Реакция не проходит в отсутствие фермента и/или перекиси водорода, а также в присутствии перекиси водорода в сочетании с ионами железа, гемаином или с пероксидазой, предварительно инактивированной инкубацией при pH 2 или обработкой 50% метанолом.

Скорость окисления невелика — всего несколько оборотов фермента в минуту. Чтобы установить, не катализируется ли эта реакция каким-либо другим ферментом, присутствующим в качестве примеси в коммерческом препарате пероксидазы, мы сопоставили активность различных фракций, полученных при его разделении ионообменной хроматографией (рис. 4). Хотя некоторые из фракций заметно различались по отношению величин поглощения при 403 и 275 нм (так называемому параметру  $R_z$ ), их каталитические активности при окислительном расщеплении 3,4-диметоксibenзоина, отнесенные к поглощению гема при 403 нм, были практически одинаковы. Поэтому можно думать, что такого рода активностью в сход-

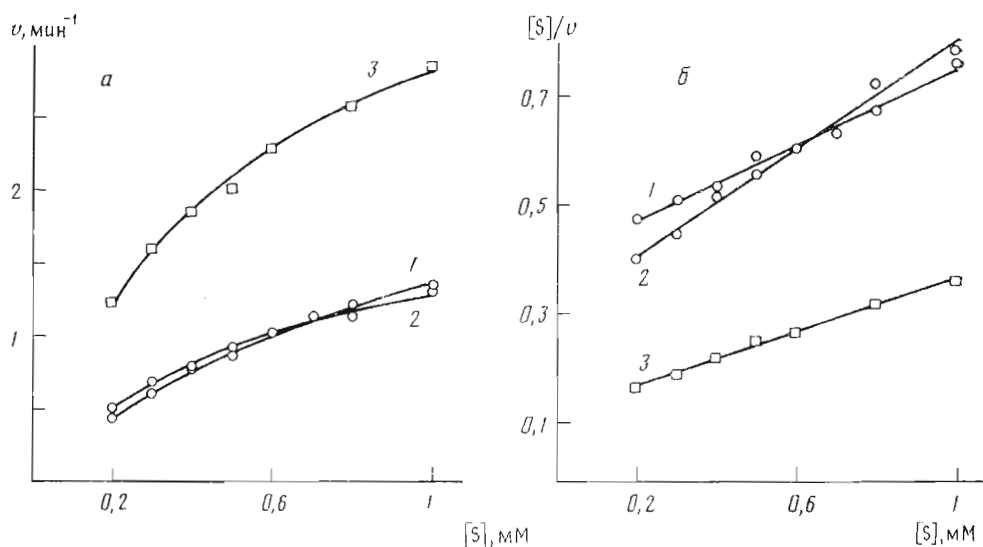


Рис. 3. Влияние концентрации субстрата на начальную скорость пероксидазного окисления соединений (II) и (III) (100 мМ Na-цитратный буфер, pH 3,5, 3 мкМ фермент, 200 мкМ  $H_2O_2$ , 25° C). Непрерывные линии исходной зависимости (а) и ее линейной анаморфозы (б) отвечают уравнению Михаэлиса — Ментен: 1 — эритро-гликоль (II) —  $K_m = 1,2 \pm 0,06$  мМ,  $V_m = 2,96 \pm 0,13$  мин<sup>-1</sup>, 2 — трео-гликоль (II) —  $K_m = 0,6 \pm 0,03$  мМ,  $V_m = 2,04 \pm 0,07$  мин<sup>-1</sup>, 3 — трео-гликоль (III) —  $K_m = 0,5 \pm 0,03$  мМ,  $V_m = 4,2 \pm 0,1$  мин<sup>-1</sup>

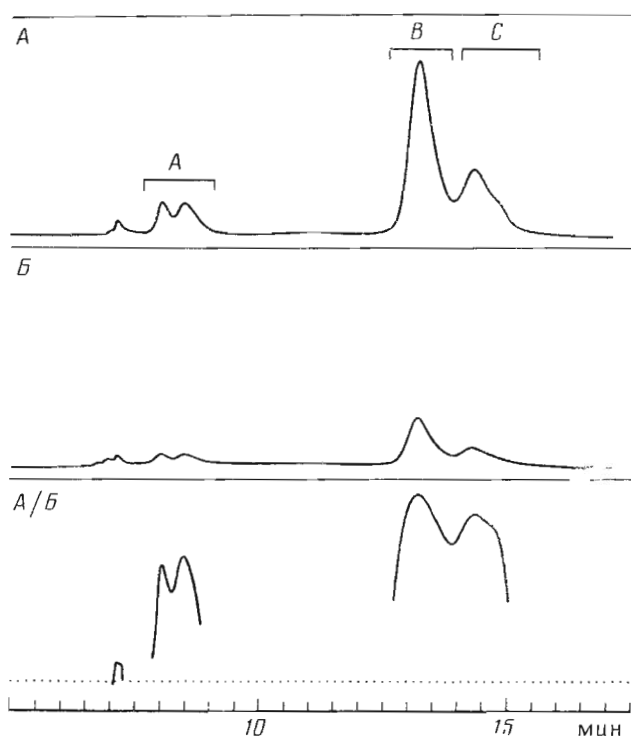


Рис. 4. Аналитическое разделение изоформ пероксидазы из хрена ионообменной хроматографией (колонка CM-Ultropac 3SW, 7,5 × 100 мм, элюент — Na-фосфатный буфер, pH 6,5, линейный градиент 2 → 10 мМ, 20 мин, 0,5 мл/мин). Фермент предварительно обессолен и освобожден от балластных белков (см. «Экспер. часть»). Мониторные длины волн 403 нм (А) и 275 нм (Б) (внизу — отношение сигналов в каналах А и Б). При препаративном разделении выделены фракции А ( $R_z$  2,55), В ( $R_z$  3,16) и С ( $R_z$  2,89)

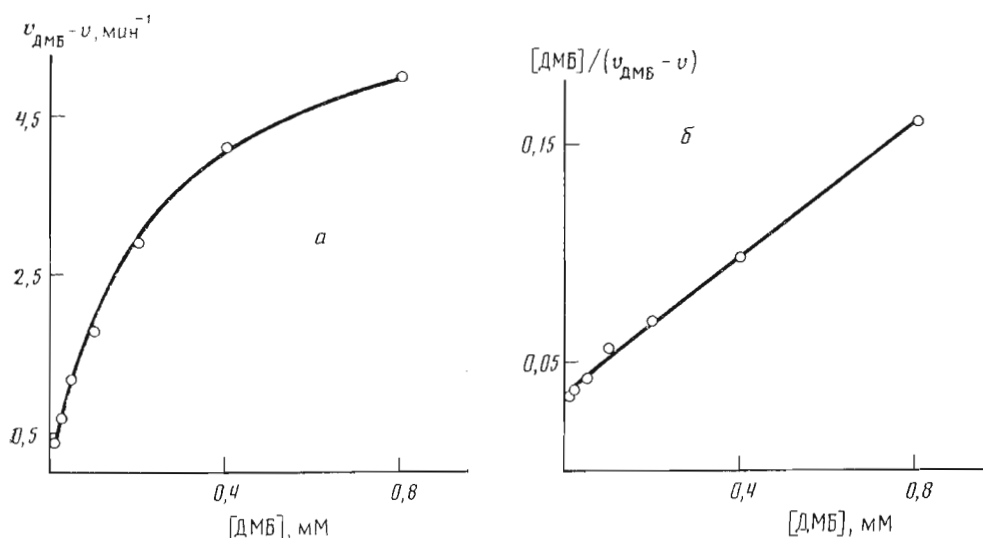


Рис. 5. Влияние концентрации 1,4-диметоксибензола (ДМБ) на начальную скорость пероксидазного окисления 3,4,4'-триметоксигидробензоина (III) (условия см. подпись к рис. 3). Непрерывные линии концентрационной зависимости (а) и ее линейной анаморфозы (б) отвечают уравнению Михаэлиса — Ментен;  $K_m^{\text{как}} = 0,17 \pm 0,01 \text{ мм}$ ,  $V_m = 6,4 \pm 0,2 \text{ мин}^{-1}$

ной мере обладают все выделенные фракции изоформ пероксидазы из хрена.

Итак, при  $\text{pH} \leq 5,5$  пероксидаза из хрена расщепляет 3,4-диметоксигидробензоин подобно грибной лигниназе. Сходство между этими ферментами проявляется и в том, что окислительное расщепление субстратов значительно ускоряется в присутствии 1,2-, 1,3- или 1,4-диметоксибензола (ср. [13]). По-видимому, катион-радикалы этих соединений, образующиеся в активном центре фермента, покидают его и окисляют молекулы субстрата в растворе. Чтобы диметоксибензолы могли служить

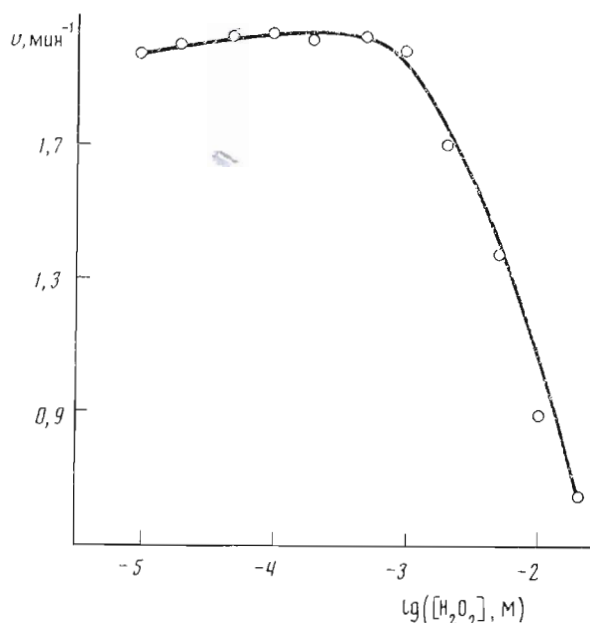


Рис. 6. Зависимость начальной скорости пероксидазного окисления 3,4,4'-триметоксигидробензоина (III) от концентрации перекиси водорода (условия — см. подпись к рис. 3)

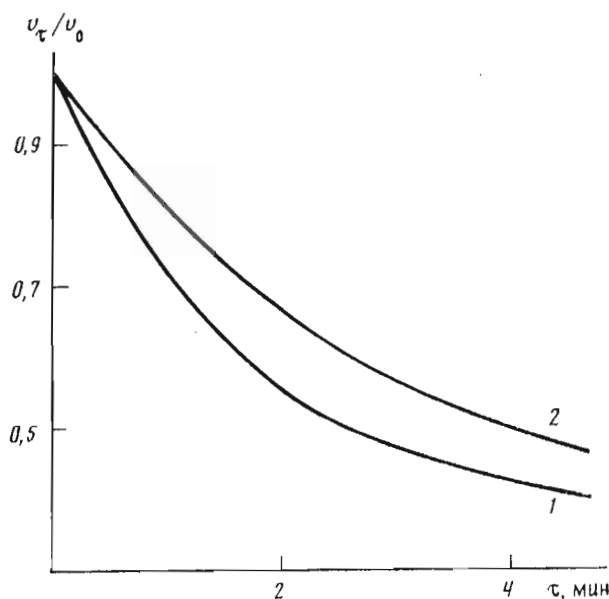


Рис. 7. Относительное уменьшение мгновенной скорости образования вератрового альдегида при пероксидазном окислении 3,4,4'-триметоксигидробензоина (III) в отсутствие (1) и в присутствии 1 мМ 1,4-диметоксибензола (2) (условия — см. подпись к рис. 3)

эффективными переносчиками электрона между ферментом и субстратом, они должны лучше, чем последний, связываться в активном центре. Мы нашли, что индуцируемое диметоксибензолами увеличение скорости образования вератрового альдегида из соединений (II) и (III) подчиняются уравнению Михаэлиса — Ментен. Определенные таким образом кажущиеся значения  $K_m^{\text{каж}}$  действительно примерно на порядок меньше величины  $K_m$  для субстратов (рис. 5).

В поисках оптимальных условий было найдено, что с ростом концентрации перекиси водорода выше 1 мМ начальная скорость окисления уменьшается (рис. 6). Такого рода ингибирование характерно и для лигниназы [1, 7, 9]. Однако пероксидаза из хрена постепенно инактивируется перекисью водорода и в меньших концентрациях. Действительно, скорость окисления уменьшается задолго до истощения перекиси водорода или субстрата (рис. 7). С другой стороны, начальная скорость окисления тем меньше, чем продолжительнее преинкубация фермента с перекисью водорода (рис. 8). По-видимому, соединения, способные восстанавливать окисленные формы пероксидазы, защищают ее от инактивации. Так, например, этот процесс тормозится 1,4-диметоксибензолом в концентрации, существенно большей  $K_m^{\text{каж}}$  (рис. 7 и 8). Наблюдать защиту фермента от инактивации 3,4-диметоксигидробензоинами (II) и (III) в концентрации, большей  $K_m$ , не удастся из-за их недостаточной растворимости в воде.

Большая часть описанных здесь экспериментов выполнена при pH 3,5. Это значение отражает компромисс между стремлением достичь наибольшей скорости реакции и необходимостью сохранить активность фермента при 25° С на относительно постоянном уровне в течение нескольких минут для определения кинетических характеристик. Если уменьшить pH от нейтральных ( $6 \leq \text{pH} \leq 7$ ) до рабочих ( $2,5 \leq \text{pH} \leq 4$ ) значений, то максимальная начальная скорость окисления субстрата достигается лишь после инкубации фермента при 20—25° С в течение нескольких минут (естественно, в отсутствие перекиси водорода). Это время существенно сокращается при увеличении ионной силы раствора до ~1 М с помощью хлорида или сульфата натрия. Заменяя эти соли на нитрат или перхлорат натрия, можно примерно вдвое увеличить на-

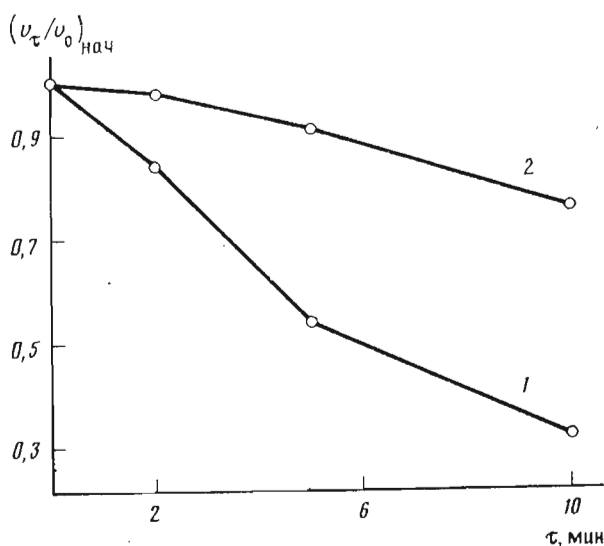
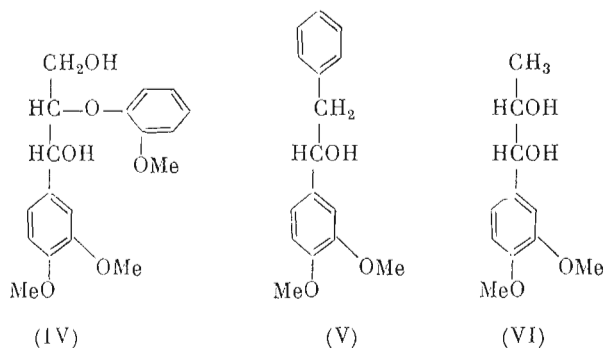


Рис. 8. Влияние преинкубации с перекисью водорода на относительную начальную скорость образования вератрового альдегида при пероксидазном окислении 3,4,4'-триметоксигидробензоина (III) в отсутствие (1) и в присутствии 1 мМ 1,4-диметоксибензола (2) (условия — см. подпись к рис. 3)

чальную скорость окисления, однако при этом ускоряется инактивация фермента перекисью водорода. В отдельных опытах было показано, что время активации фермента при подкислении не зависит от его концентрации и процесс не обращается при уменьшении температуры. Эти данные позволяют предположить, что причиной активации пероксидазы является остающийся пока не изученным рН-зависимый конформационный переход.



Различия между лигниназой и пероксидазой из хрена в наибольшей степени проявляются в субстратной специфичности. Такие соединения, как 1-(3,4-диметоксифенил)-2-(2-метоксифенокси)-1,3-пропандиол (так называемый β-О-эфир) (IV) и 3,4-диметоксифенилбензилкарбинол (V), успешно расщепляемые лигниназой [1, 2], вполне устойчивы к действию пероксидазы. С очень малой скоростью в присутствии пероксидазы образуется вератровый альдегид из метильного аналога 3,4-диметоксигидробензоина (II) — 1-(3,4-диметоксифенил)-1,2-пропандиола (VI).

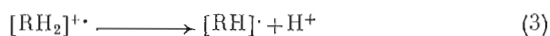
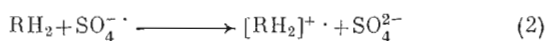
Особенно нагляден пример вератрилового спирта, обычно используемого при определении активности лигниназы ( $K_m$  72 мкМ) [1, 9, 14]. Пероксидаза из хрена окисляет вератриловый спирт (как и соединения (IV) — (VI)) в вератровый альдегид примерно в 10 раз медленнее, чем гидробензоины, и обнаружить образование последнего удастся лишь при высокой концентрации субстрата ( $\geq 2$  мМ).

На первый взгляд эти различия резонно объяснить малым сродством активного центра пероксидазы к «плохим» субстратам. Однако «хорошие» и «плохие» субстраты пероксидазы, по-видимому, могут различаться не столько скоростью окисления ферментом в катион-радикалы, сколько выходом регистрируемых продуктов (вератрового альдегида) в ходе вторичных превращений этих катион-радикалов. Так, вератриловый спирт (I) и гликоль (VI) способны в относительно низких концентрациях (<1 мМ) ускорять катализируемое пероксидазой окислительное расщепление соединений (II) и (III). Этот эффект вполне сходен с действием диметоксибензолов (ср. [13, 15]). Между тем функционировать в качестве переносчиков электрона оба указанные соединения могут лишь в том случае, если они хорошо связываются ферментом и достаточно быстро им окисляются. Поэтому малая скорость образования вератрового альдегида при их окислении скорее всего указывает на протекание каких-то конкурирующих превращений катион-радикалов.

Суммируя приведенные выше данные, можно сказать, что сходство между лигниназой и пероксидазой из хрена заключается в их способности окислять лигниноподобные соединения в кислой среде, а основная разница между ними сводится к различиям в характере превращений катион-радикалов. Было необходимо установить, в какой мере лигнинолитическая активность определяется свойствами самих катион-радикалов.

Схема 2

Механизм окисления органических соединений персульфатом



Для решения этой задачи представлялось целесообразным исследовать превращения катион-радикалов лигниноподобных соединений, генерируемых в неферментативной реакции. Мы полагали, что для этого наиболее удобно использовать одноэлектронное окисление анион-радикалами  $\text{SO}_4^{\cdot -}$ , образующимися при термической диссоциации персульфатных ионов  $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$  (см. схему 2), которое, как показали наши дальнейшие исследования, можно проводить не только в водных растворах, но и в неводных средах. Персульфатное окисление бензиловых спиртов и гликолей довольно часто используют в препаративных целях [16]. Ранее эту реакцию уже рассматривали как способ имитировать энзиматическую деградацию лигнина [5, 17].

При персульфатном окислении бензиловых спиртов и диарилглико-

Таблица 1

Зависимость скорости персульфатного окисления в водной среде от концентрации субстрата ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  25 мМ, pH 1, 40° С)

| Соединение                         | Скорость образования альдегида *, мМ/мин, при концентрации субстрата, мМ |      |      |
|------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|------|------|
|                                    | 0,25                                                                     | 0,5  | 1    |
| Бензиловый спирт                   | 10,7                                                                     | 12,0 | 12,9 |
| Вератриловый спирт                 | 0,80                                                                     | 0,80 | 0,80 |
| Гидробензоин                       | 9,5                                                                      | 9,7  | 10,0 |
| трео-3,4,4'-Триметоксигидробензоин | 9,0                                                                      | 9,0  | 9,0  |

\* Для триметоксигидробензоина приведена скорость образования вератрового альдегида, а для гидробензоина — половинное значение скорости образования бензальдегида.

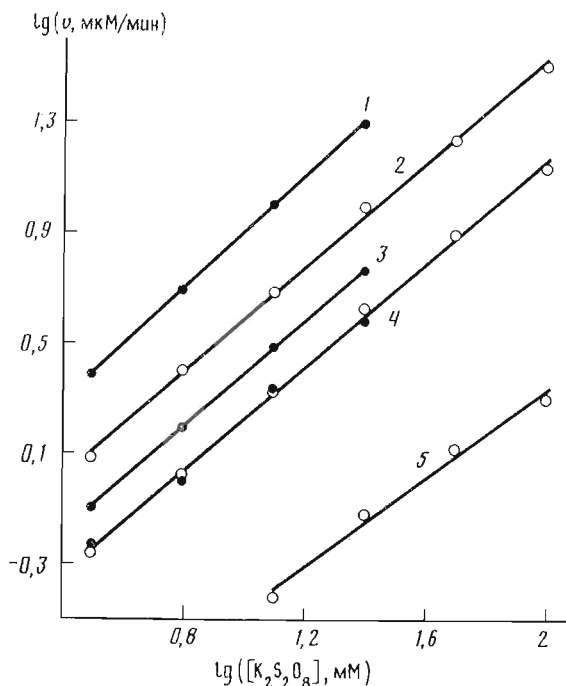


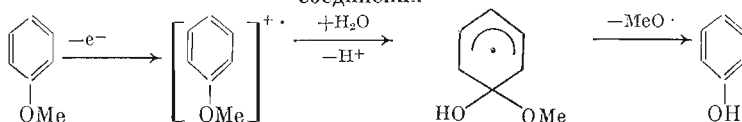
Рис. 9. Влияние концентрации персульфата калия на скорость образования альдегидов в водном растворе (0,5 мм субстрат, pH 1; 40° С). Субстраты (в скобках — наклон прямых): 1 — гидробензойн (1,0), 2 — *трео*-3,4,4'-триметоксигидробензойн (0,94), 3 — бензиловый спирт (0,95), 4 — *трео*-3,4-диметоксигидробензойн (0,93), 5 — вератриловый спирт (0,8) (темные кружки — бензальдегид, светлые — вератровый альдегид)

лей в водном растворе «узким местом», т. е. кинетически значимой стадией этого процесса, является генерация анион-радикалов  $\text{SO}_4^{\cdot-}$ . Действительно, скорость образования альдегидов лишь очень слабо зависит от концентрации окисляемого вещества (табл. 1). Далее, зависимость этой скорости от концентрации персульфата близка к линейной (рис. 9). Между тем, если восстановление анион-радикалов протекает медленнее, чем их генерация и рекомбинация, скорость накопления продуктов окисления в соответствии с известным законом разбавления Оствальда должна в пределе быть пропорциональна  $V[\text{S}_2\text{O}_8^{2-}]$ . Наконец, энергия активации образования альдегидов при персульфатном окислении бензиловых спиртов и гликолей в диапазоне 25—50° С практически не зависит от природы окисляемого вещества ( $18 \pm 1,5$  ккал/моль).

Таким образом, наблюдаемые различия в скоростях образования альдегидов (табл. 2) отражают не разницу в реакционной способности соединений на стадии первого одноэлектронного окисления, а вклад альтернативных превращений возникающих при этом катион-радикалов. Судя по тому, что скорость образования альдегидов при окислении бензиловых спиртов монотонно уменьшается с увеличением числа метоксильных заместителей, одним из таких альтернативных превращений, конкурентных по отношению к вторичному окислению в альдегид, является деметилирование катион-радикала (схема 3). Ранее было показано, что деметилированию подвергаются катион-радикалы, образующиеся из полиметоксибензолов при их окислении перекисью водорода в присутствии лигниназы [6].

Схема 3

Деметилирование катион-радикалов метоксизамещенных ароматических соединений



## Скорость образования альдегидов при персульфатном окислении лигниноподобных соединений в воде и в ацетонитриле

| Соединение                                                     | Скорость *, мкМ/мин |                       |
|----------------------------------------------------------------|---------------------|-----------------------|
|                                                                | H <sub>2</sub> O ** | CH <sub>3</sub> CN ** |
| Бензиловый спирт                                               | 12,4                | 0,66                  |
| Анисовый спирт                                                 | 8,2                 | 1,60                  |
| Вератриловый спирт                                             | 0,76                | 6,05                  |
| 3,4,5-Триметоксибензиловый спирт                               | 0                   |                       |
| Гидробензоин                                                   | 10                  | 1,14                  |
| <i>трео</i> -3,4,4'-Триметоксигидробензоин (III)               | 9,2                 | 7,58                  |
| <i>трео</i> -3,4-Диметоксигидробензоин (II)                    | 5,3                 | 7,58                  |
| <i>трео</i> -3,4-Диметокси-2,3',4',5',6'-пентафторгидробензоин | 4,9                 | 7,95                  |
| <i>трео</i> -3,4-Диметокси-4'-нитрогидробензоин                | 1,1                 | 2,45                  |
| 1-(3,4-Диметоксифенил)-1,2-пропандиол (VI)                     | 5,8                 | 6,20                  |
| 3,4-Диметоксифенилбензилкарбинол (V) **                        | 0                   | 4,03                  |
| β-О-Эфир (IV) **                                               | 0                   | 7,75                  |

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

\*\* Субстрат 0,5 мМ, персульфат калия 25 мМ, рН 1, 40° С.

\*\* Субстрат 0,5 мМ, персульфат калия 4 мМ, 18-корона-6 15 мМ, 50° С.

\*\* Вычислено по росту оптической плотности при 308 нм в пересчете на вератровый альдегид.

Существенно, что с увеличением числа метоксильных заместителей замедляется не только образование альдегида, но и уменьшение концентрации исходного бензилового спирта. Отсюда можно заключить, что фенолы — продукты деметилирования, а также вещества, возникающие при их дальнейшем окислении, эффективно конкурируют с исходными спиртами как доноры электрона при восстановлении анион-радикалов SO<sub>4</sub><sup>•-</sup>.

Роль деметилирования как процесса, альтернативного образованию альдегидов, может быть продемонстрирована на примере ингибирования диметоксибензолами окисления бензилового спирта или гидробензоина в бензальдегид. Хроматографически легко наблюдать, как через некоторое время окисление этих соединений заметно тормозится уже в присутствии 1 мол. % ингибитора и практически полностью подавляется при его эквимольных добавках. Обращает на себя внимание лаг-период, предшествующий достижению максимального торможения (рис. 10), существование которого естественно объяснить накоплением ингибиторов — продуктов деметилирования до их стационарной концентрации. Вератриловый и 3,4,5-триметоксибензиловый спирты также ингибируют окисление бензилового спирта и гидробензоина (а также ди- и триметоксипроизводных последнего).

Заметим, что в данных условиях способность диметоксибензолов служить переносчиками электрона не может быть выявлена, поскольку скорость персульфатного окисления в отличие от ферментативной реакции определяется не переносом электрона, а генерацией окислительных эквивалентов. С другой стороны, ингибирование продуктами деметилирования не обнаруживается при ферментативном окислении, поскольку их концентрация мала, а сродство к ферменту, по всей видимости, не слишком велико.

При окислении 3,4-диметоксифенилзамещенных вицинальных гликолей деметилирование первичного катион-радикала является процессом, альтернативным разрыву центральной С—С-связи. Отсутствие этой альтернативной реакции несомненно определяет относительно высокую скорость образования бензальдегида из незамещенного гидробензоина (см. табл. 2). Вероятность расщепления С—С-связи в катион-радикалах 3,4-диметоксипроизводных гидробензоина возрастает при введении во второй фенильный остаток электронодонорных и уменьшается при введении электроноакцепторных заместителей.

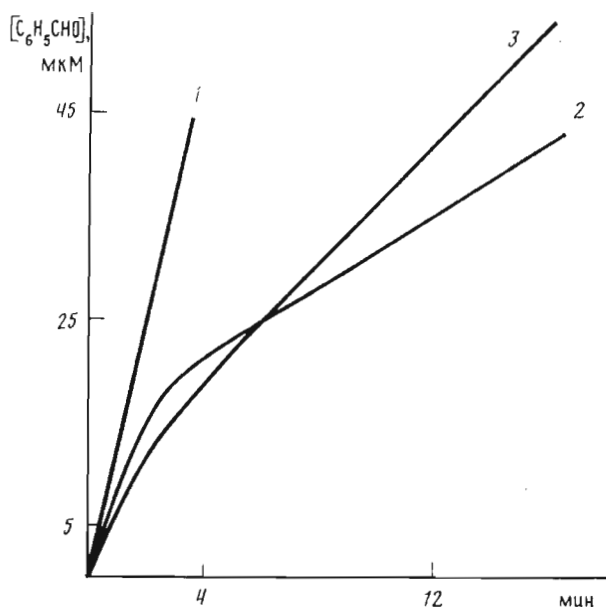


Рис. 10. Ингибирование диметоксибензолом и вератриловым спиртом образования бензальдегида при персульфатном окислении гидробензоина в водном растворе (условия — см. подпись к рис. 9; концентрация ингибитора 0,05 мМ; половинная величина концентрации бензальдегида отвечает концентрации прореагировавшего гидробензоина): 1 — контроль, 2 — 1,2-диметоксибензол, 3 — вератриловый спирт

Интересно, что по скорости окислительного расщепления персульфатом метилзамещенный гликоль (VI) не слишком отличается от своего фенилзамещенного аналога (II), тогда как ферментативное расщепление последнего протекает существенно быстрее. Можно предположить, что по меньшей мере одним из факторов, определяющих такое различие, служат разные направления распада катион-радикалов этих соединений. Катион-радикал фенилзамещенного гликоля (II), по-видимому, расщепляется преимущественно на гидроксibenзильный радикал и диметоксигидроксibenзильный катион, который, депротонируясь, превращается непосредственно в вератровый альдегид (см. схему 1; ср. [7]). При распаде же катион-радикала метилзамещенного гликоля (VI) скорее всего образуются катион, отвечающий протонированному ацетальдегиду, и диметоксигидроксibenзильный радикал, который на пути к вератровому альдегиду должен подвергнуться повторному одноэлектронному окислению. Если первое и второе окисление сильно разделены во времени, то различные альтернативные превращения диметоксигидроксibenзильного радикала могут значительно уменьшить выход вератрового альдегида. Именно такова, вероятно, ситуация при окислении гликоля (VI) перекисью водорода в присутствии пероксидазы из хрена. Такой же диметоксигидроксibenзильный радикал промежуточно возникает и из катион-радикала вератрилового спирта; возможно, это наряду с деметилированием катион-радикала является причиной малой скорости образования вератрового альдегида при ферментативном окислении вератрилового спирта.

Поскольку деметилирование метоксизамещенных ароматических катион-радикалов протекает с участием воды (см. схему 3), естественно предположить, что вклад этого процесса упадет при уменьшении ее содержания в среде. В табл. 2 приведены скорости образования альдегидов при окислении бензиловых спиртов и диарилгликолей персульфатом калия, растворенным в безводном ацетонитриле с помощью 18-короны-6. В этих условиях реакция ускоряется с увеличением концентрации окисляемого вещества (рис. 11), причем эта зависимость тем ближе к линейной, чем медленнее протекает окисление; отсюда следует, что «узким местом»

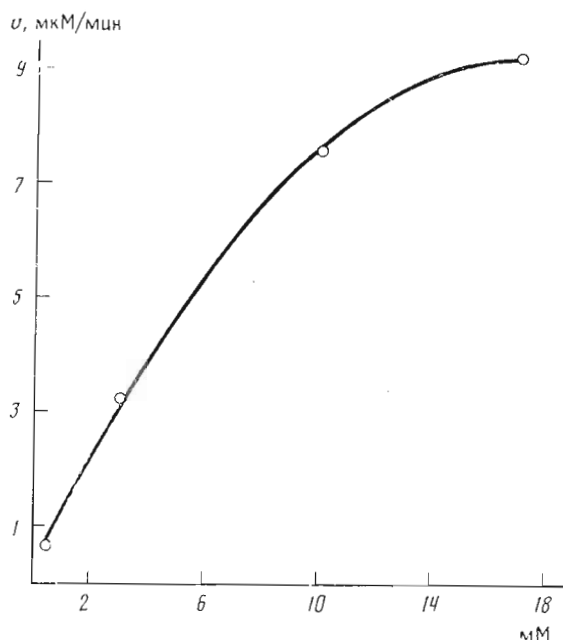


Рис. 11. Зависимость скорости образования бензальдегида от концентрации бензилового спирта при его окислении персульфатом калия в безводном ацетонитриле (4 мМ персульфат калия, 15 мМ 18-корона-6; 50° С)

процесса является перенос электрона к анион-радикалам  $\text{SO}_4^{\cdot-}$ . В области малых концентраций вератрилового спирта, как и следует ожидать, окисляется гораздо быстрее, чем бензиловый, поскольку его потенциал ионизации заметно ниже. С увеличением концентрации, когда скорость реакции определяется уже не реакционной способностью спиртов, а генерацией анион-радикалов  $\text{SO}_4^{\cdot-}$ , окисление вератрилового и бензилового спиртов протекает со сравнимыми скоростями (рис. 12). Именно таким должен быть результат подавления конкурирующей реакции деметилирования катион-радикалов вератрилового спирта.

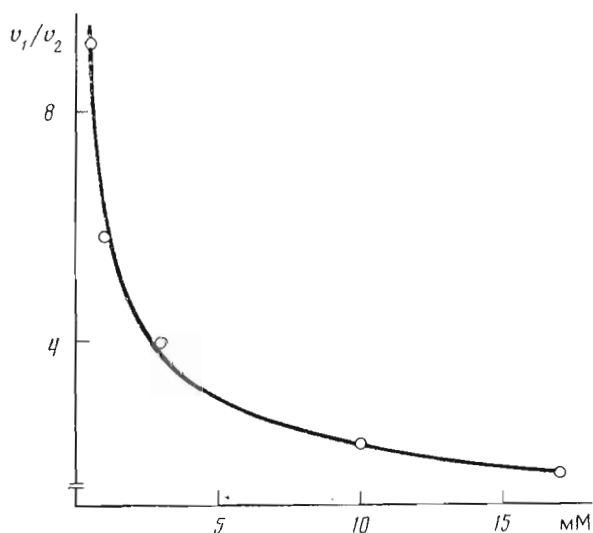


Рис. 12. Влияние концентрации субстратов на отношение скоростей образования альдегидов при окислении вератрилового ( $v_1$ ) и бензилового ( $v_2$ ) спиртов персульфатом калия в безводном ацетонитриле (условия — см. подпись к рис. 11)

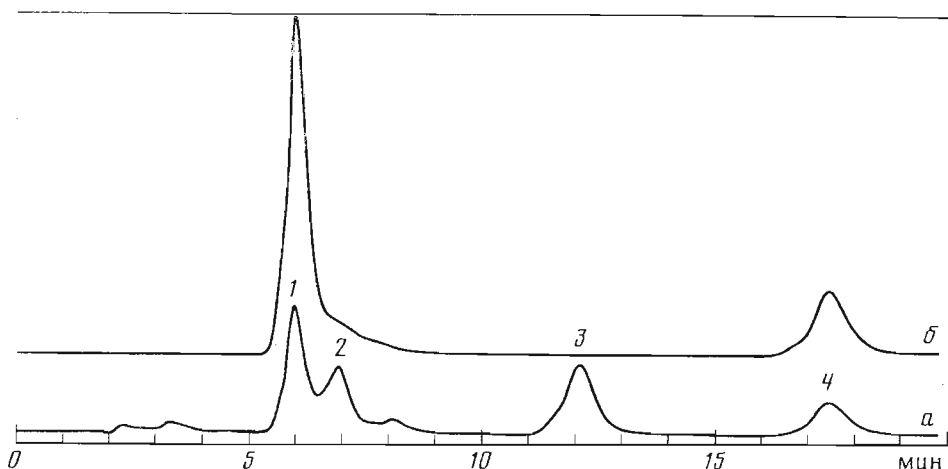


Рис. 13. Хроматографическая идентификация вератрового альдегида (1), бензальдегида (2) и 3,4-диметоксифенилбензилкетона (4), образовавшихся при окислении 3,4-диметоксифенилбензилкарбинола (3) персульфатом калия в безводном ацетонитриле (условия — см. подпись к рис. 11; [S] 0,5 мМ; время инкубации 1,5 ч). ВЭЖХ: колонка Zorbax ODS (4,6 × 250 мм), элюент — метанол — вода (3 : 2), 1,2 мл/мин, мониторные длины волн 250 (а) и 308 нм (б)

Аналогичная картина наблюдается при окислении в безводной среде вицинальных диарилгликолей. Незамещенный гидробензоин в этих условиях расщепляется заметно медленнее, чем его 3,4-диметоксипроизводные (см. табл. 2). Скорость же расщепления последних слабо зависит от природы заместителей во втором фенильном остатке, поскольку из-за разрыва цепи сопряжения последняя не может сильно сказаться на окислительно-восстановительном потенциале.

Исходя из этих результатов, можно было предположить, что устойчивость С—С-связи в β-О-эфире (IV) и 3,4-диметоксифенилбензилкарбиноле (V) к окислительному расщеплению персульфатом в водной среде объясняется тем, что основным превращением катион-радикалов этих соединений является О-деметилирование. Действительно, как спектрофотометрические данные (см. табл. 2), так и результаты ВЭЖХ (рис. 13) свидетельствуют о том, что в безводной среде оба эти соединения успешно расщепляются персульфатом с образованием вератрового альдегида. При окислении карбинола (V) наряду с вератровым альдегидом среди продуктов реакции идентифицирован 3,4-диметоксифенилбензилкетон. Его образование отражает соизмеримость вероятностей разрыва С—С-связи и повторного одноэлектронного окисления.

В целом по своей субстратной специфичности окисление исследованных соединений персульфатом в водной среде имеет много общего с их окислением перекисью водорода в присутствии пероксидазы из хрена, тогда как персульфатное окисление в безводной среде сходно с действием грибной лигниназы. Мы полагаем, что эти аналогии отражают, возможно, основное различие между пероксидазой и лигниназой как катализаторами окислительного расщепления лигниноподобных субстратов. При связывании в активном центре лигниназы эти субстраты изолируются от водного окружения на время, в пределах достаточное для осуществления двух последовательно протекающих реакций одноэлектронного окисления и/или разрыва С—С-связи в первичном катион-радикале. Напротив, при пероксидазном катализе первичный катион-радикал либо недостаточно изолирован от воды, либо покидает активный центр заведомо раньше, чем фрагментируется или повторно окисляется. Благодаря этому вклад деметилирования в превращения катион-радикалов увеличивается, и реально удается наблюдать расщепление С—С-связи только в таких соединениях (например, в гидробензоинах), катион-радикалы которых распадаются особенно быстро. Основной причиной здесь скорее всего является

рН-Зависимость скорости образования альдегидов при персульфатном окислении в водной среде (субстрат 0,5 мМ, персульфат калия 25 мМ, 40° С)

| Соединение                         | Скорость *, мкМ/мин |        |        |
|------------------------------------|---------------------|--------|--------|
|                                    | рН 1,0              | рН 3,5 | рН 7,0 |
| Вератриловый спирт                 | 0,79                | 0,80   | 0,80   |
| Гидробензоин                       | 9,9                 | 8,0    | 6,6    |
| трео-3,4,4'-Триметоксигидробензоин | 9,8                 | 7,3    | 6,2    |

\* Для триметоксигидробензоина приведена скорость образования вератрового альдегида, а для гидробензоина — половинное значение скорости образования бензальдегида.

именно малое время жизни катион-радикала в связанном виде, поскольку, с одной стороны, пероксидазный катализ характеризуется довольно высокими значениями  $K_m$ , а с другой — удаётся, как указывалось выше, использовать образующиеся катион-радикалы в качестве переносчиков электрона.

Очевидно, при разработке любого химического или биотехнологического процесса окислительной деструкции лигнина, который по своим результатам должен имитировать действие грибной лигниназы, т. е. разрушать главным образом С—С-связи, необходимо позаботиться о том, чтобы катион-радикалы, образующиеся при первом одноэлектронном окислении, не оказались в водном окружении.

Мы попытались моделировать активный центр лигниназы, включив субстраты персульфатного окисления в гидрофобную полость циклоамилоз ( $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -циклодекстринов, а также частично метилированного  $\beta$ -циклодекстрина). Можно было ожидать, что исключение воды из окружения молекулы-«гостя» в клатрате скажется, в частности, на соотношении скоростей образования альдегидов из соединений, содержащих и не содержащих метоксильные группы (например, из вератрилового и бензилового спиртов). Нам, однако, не удалось обнаружить никаких эффектов, обусловленных включением, вплоть до молярного отношения «хозяин»: «гость» = 20 : 1. Тому возможны по меньшей мере две причины: во-первых, обмен связанных молекул субстрата со средой происходит быстрее, чем их окисление, и, во-вторых, комплекс дестабилизируется при превращении нейтральной молекулы-«гостя» в катион-радикал. Последнее должно иметь место из-за ион-дипольных взаимодействий в полости «хозяина» [18].

Скорость образования альдегидов при персульфатном окислении как незамещенных, так и метоксилированных бензиловых спиртов и диарилгликолей весьма слабо зависит от рН (см. табл. 3; ср. [19]). Это означает, что соотношение вкладов образования альдегидов и альтернативных превращений катион-радикалов нечувствительно к изменениям рН. Таким образом, своей зависимостью от рН окисление лигниноподобных субстратов лигниназой и пероксидазой из хрена обязано не свойствам промежуточных катион-радикалов, а диссоциации определенных групп в молекуле фермента.

Известно, что скорость образования ключевой окисленной формы многих гемсодержащих пероксидаз, так называемого «соединения I», монотонно падает с уменьшением рН ниже 4—5 [20—23]. У лигниназы, напротив, скорость образования «соединения I» в сходных условиях не зависит от рН [24]. Между тем и у лигниназы, и у пероксидазы из хрена скорость окисления лигниноподобных субстратов монотонно возрастает с уменьшением рН. Вероятно, «узким местом» при ферментативном окислении является перенос электрона от субстрата к окисленному тему, скорость которого контролируется окислительно-восстановительным потенциалом последнего.

Можно предположить, что рН-зависимость окислительно-восстановительного потенциала окисленных форм данных двух гемсодержащих

пероксидаз при  $\text{pH} \leq 5,5$  определяется степенью диссоциации одной или нескольких карбоксильных групп фермента. Если это так, активность обоих ферментов в отношении лигниноподобных субстратов возрастает с увеличением доли недиссоциированных, т. е. незаряженных, карбоксильных групп. Таким образом, существует вероятность, что этерификация или амидирование этих групп могут привести к ферменту, активному и при  $\text{pH} > 5,5$ .

Исходя из этого, мы подвергли пероксидазу из хрена при  $\text{pH}$  3,5 и 7 действию мощного этерифицирующего агента — борфторида триэтилоксиона [25], взятого в большом избытке ( $> 500$  моль/моль белка). Фермент после этого сохранил активность, однако  $\text{pH}$ -зависимость катализируемого им расщепления гликоля (III) не изменилась. Сходная картина наблюдалась и при амидировании карбоксильных групп дианизидином в присутствии водорастворимого карбодиимида [26]. Отсюда следует, что, если какие-либо карбоксильные группы определяют  $\text{pH}$ -чувствительность фермента, они не принадлежат к числу доступных. На очереди попытка модификации карбоксильных групп в апобелке пероксидазы с последующей реконструкцией фермента. С другой стороны, нельзя исключить, что искомые функционально важные карбоксильные группы принадлежат пропионильным остаткам гема.

Полученные данные позволили установить определенное сходство между пероксидазой из хрена и грибной лигниназой и объяснить различия в действии этих ферментов на лигниноподобные соединения. Мы полагаем, что в основе этих различий лежит разница во вкладе расщепления  $\text{C—O}$ -связей (в частности, деметилирования) в превращения катион-радикалов. В действительности, лигниназа и сходные с ней ферменты — это лишь один и, по-видимому, необязательный компонент набора пероксидаз, которые продуцируют организмы, разрушающие лигнин. Возможно, каждая пероксидаза в таком наборе настроена на определенный баланс между альтернативными превращениями катион-радикалов, в частности между расщеплением  $\text{C—O}$ - и  $\text{C—S}$ -связей. В совокупности эти ферменты реализуют оптимальную для данного организма стратегию разрушения лигнина определенного типа. Если эта гипотеза окажется верной, открываются новые возможности при создании биотехнологических методов утилизации лигнина, поскольку выбор компонентов набора окислительных ферментов можно будет разумно подчинить конечным целям процесса.

Авторы искренне признательны Г. И. Бачмановой (НИИФХМ МЗ РСФСР), неизменно поддерживавшей данное исследование, а также Б. И. Миднеру и А. А. Ходонову (МИТХТ им. М. В. Ломоносова), любезно предоставившим препараты фосфониевых солей и частично метилированный  $\beta$ -циклодекстрин.

### Экспериментальная часть

В работе использовали в основном препарат пероксидазы из хрена производства Reanal (ВНР) активностью 700 ед./мг по *o*-дианизидину. Раствор 500 мг пероксидазы в  $\text{Na}$ -цитратном буфере (10 мМ,  $\text{pH}$  3,5; 120—150 мг белка/мл) после 8—10 ч инкубации при  $4^\circ\text{C}$  отделяли центрифугированием от нерастворимых примесей и подвергали гель-фильтрации на колонке Sephadex G-25 (особо мелкий,  $10 \times 400$  мм). Окрашенную фракцию, отделенную от солей и низкомолекулярных примесей, концентрировали ультрафильтрацией на мембране PM-10 (Amicon, США) до объема 5 мл и наносили на колонку DEAE-Toyopearl 650 M ( $8 \times 150$  мм), к выходу из которой присоединяли колонку CM-Toyopearl 650S ( $10 \times 400$  мм). Обе колонки предварительно уравнивали с  $\text{Na}$ -фосфатным буфером (1 мМ,  $\text{pH}$  6,5). После того, как при элюции тем же буфером основная окрашенная зона переходила во вторую колонку, первую колонку с адсорбированной на ней основной массой балластных белков выключали из потока и продолжали элюцию при линейном увеличении концентрации буфера (1  $\rightarrow$  10 мМ, 1 ч, 2 мл/мин), собирая фракции, состав которых указан на рис. 5. После концентрирования этих фракций ультрафильтрацией их хранили при  $4^\circ\text{C}$  в виде растворов, сохраняющих пероксидазную активность по *o*-дианизидину и 3,4-диметоксинигидробензону неизменной в течение по крайней мере месяца. Все хроматографические процедуры выполняли при комнатной температуре. Без дополнительной очистки в некоторых опытах использовали пероксидазу из хрена производства Sigma (США), (тип VI, активность 3250 ед./мг по *o*-дианизидину), которая хроматографически подобна фракции В (см. рис. 5). В большинстве кинетических экспериментов использовали фракцию В, а в препаративных — фермент после гель-фильтрации.

1,2-, 1,3- и 1,4-Диметоксибензолы получали обработкой диметилсульфатом соответствующих дифенолов и очищали перегонкой в вакууме и кристаллизацией. Анисовый и вератриловый спирты получали восстановлением  $\text{LiAlH}_4$  соответствующих альдегидов. Для получения 3,4,5-триметоксибензилового спирта пропилгаллат метилировали избытком диметилсульфата; образовавшийся пропиловый эфир триметоксибензойной кислоты далее восстанавливали  $\text{LiAlH}_4$ . После перегонки в вакууме в токе аргона бензиловые спирты при необходимости очищали до хроматографической чистоты с помощью ВЭЖХ на колонке Zorbax Sil (Dupont, США) в системах эфир — гексан.

1-(3,4-Диметоксифенил)-1,2-пропандиол (VI) в виде смеси *эритро*- и *трео*-изомеров (1 : 3) получали окислением  $\text{OsO}_4$  в эфире, содержащем следы пиридина, промышленного образца смеси метиловых эфиров *цис*- и *транс*-изоэвенолов (ср. [27]); продукт реакции очищали посредством ВЭЖХ на колонке Zorbax ODS (Dupont, США) в системе метанол — вода (1 : 4).

*эритро*-3,4-Диметоксигидробензоин (II) получали восстановлением  $\text{LiAlH}_4$  в эфире бензоина, образующегося при конденсации вератрового и бензойного альдегидов и выделенного из реакционной смеси хроматографией на колонке Lichrospher C-8 (Merck, ФРГ) в системе метанол — вода (1 : 1,5). Продукт восстановления очищали хроматографией на колонке Zorbax Sil ( $25,4 \times 460$  мм) в системе метанол — эфир (1 : 50).

*транс*-Изомеры 3,4-диметоксистильбена и его 4'-метокси-, 4'-нитро- и 2',3',4',5',6'-пентафторпроизводных, полученные реакцией Виттига из вератрового альдегида и соответствующих фосфониевых солей в условиях, которые описаны в работе [28], далее тщательно очищали от примесей *цис*-изомеров и трифенилфосфиноксида. Хроматографически чистые *транс*-стильбены окисляли в *трео*-гликоли с помощью  $\text{OsO}_4$  в пиридине, используя для разложения осмиевых комплексов насыщенный водный раствор мавнита. Полученные гликоли очищали кристаллизацией или ВЭЖХ до хроматографически чистого состояния.

3,4-Диметоксифенилбензилкарбинол (V) получали по Гриньяру из хлористого бензила и вератрового альдегида. 1-(3,4-Диметоксифенил)-2-(2-метоксифенокси)-1,3-пропандиол (IV) синтезировали по схеме, подобной приведенной в работе [29]. Борфторид триэтилоксония получали согласно прописи [30].

Строение полученных соединений доказано данными их УФ-, ЯМР- и масс-спектров, а у 1,2-гликолей подтверждено результатами их окислительного расщепления персульфатом.

Без дополнительной очистки использовали *о*-дианизидин (Sigma, США),  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -циклодекстрины (Serva, ФРГ), 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодимид (Serva, ФРГ), а также реагенты и соли отечественного производства марок ос. ч., х.ч. и ч.д.а. Для приготовления растворов использовали дистиллированную воду.

Для ВЭЖХ использовали насосные системы Dialagrad 382 и 384 (ISCO, США) или В-100-S2 (Eldex, США) и спектрофотометрический детектор с диодной матрицей HP 1090 (Hewlett-Packard, США). Для приготовления буферных растворов применяли титратор ТТТ-2 (Radiometer, Дания). Спектральные измерения выполняли на спектрофотометре 2400 (Gilford, Франция), кюветное отделение которого термостатировалось с точностью  $\pm 0,5^\circ\text{C}$  с помощью водяного криостата-термостата.

При оценке концентрации веществ в растворах и спектрофотометрическом определении скорости реакций использовали следующие значения молекулярных коэффициентов поглощения в  $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  (в скобках длина волны в нм): пероксидаза из хрена —  $10^5$  (403), бензальдегид — 11 700 (250), анисовый альдегид — 1200 (308), вератровый альдегид — 9600 (308), 3440 (330), *n*-нитробензальдегид — 830 (330), 3,4-диметокси-4'-нитрогидробензоин — 1400 (330).

Амидирование карбоксильных групп в пероксидазе из хрена *о*-дианизидином проводили в условиях, описанных в работе [26]. Этерификацию этих групп борфторидом триэтилоксония осуществляли с помощью рН-стата при  $3\text{--}5^\circ\text{C}$ .

## ЛИТЕРАТУРА

1. Tien M., Kirk T. K. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 8. P. 2280—2284.
2. Gold M. H., Kuwahara M., Chiu A. A., Glenn J. K. // Arch. Biochem. and Biophys. 1984. V. 234. № 2. P. 353—362.
3. Kirk T. K., Farrell R. L. // Annual Rev. Microbiol. 1987. V. 41. P. 465—507.
4. Harvey P. J., Schoemaker H. E., Palmer J. M. // Plant, Cell and Environment. 1987. V. 10. № 3. P. 709—715.
5. Schoemaker H. E., Harvey P. J., Bowen R. M., Palmer J. M. // FEBS Lett. 1985. V. 183. № 1. P. 7—12.
6. Kersten P. J., Tien M., Kalyanaraman B., Kirk T. K. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. № 5. P. 2609—2612.
7. Hammel K. E., Tien M., Kalyanaraman B., Kirk T. K. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. № 14. P. 8348—8353.
8. Hammel K. E., Kalyanaraman B., Kirk T. K. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 11. P. 3708—3712.
9. Tien M., Kirk T. K., Bull C., Fee J. A. // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. № 4. P. 1687—1693.
10. Kuila D., Tien M., Fee J. A., Ondrias M. R. // Biochemistry, 1985. V. 24. № 14. P. 3394—3397.

11. Andersson L. A., Renganathan V., Chiu A. A., Locher T. M., Gold M. H. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. № 10. P. 6080—6087.
12. Renganathan V., Gold M. H. // Biochemistry. 1986. V. 25. № 7. P. 1626—1631.
13. Harvey P. J., Schoemaker H. E., Palmer J. M. // FEBS Lett. 1986. V. 195. № 1—2. P. 242—246.
14. Leisola M. S., Schmidt B., Fiechter A. // Analyt. Biochem. 1986. V. 155. № 1. P. 108—111.
15. Haemmerli S. D., Leisola M. S., Fiechter A. // FEMS Microbiol. Lett. 1986. V. 35. № 1. P. 33—36.
16. Minisci F., Citterio A. // Acc. Chem. Res. 1983. V. 16. № 1. P. 27—32.
17. Huynh V.-B. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1986. V. 139. № 3. P. 1104—1110.
18. Овчинников Ю. А., Иванов В. Т., Шкроб А. М. Мембрано-активные комплексы. М.: Наука, 1974. С. 223—224.
19. Snook M. E., Hamilton G. A. // J. Amer. Chem. Soc. 1974. V. 96. № 3. P. 860—869.
20. Dolman D., Newell G. A., Thurlow M. D., Dunford H. B. // Can. J. Biochem. 1975. V. 53. № 5. P. 495—501.
21. Dunford H. B., Hewson W. D., Steiner H. // Can. J. Chem. 1978. V. 56. № 22. P. 2844—2852.
22. Job D., Richard J., Dunford H. B. // Can. J. Biochem. 1978. V. 56. № 7. P. 702—707.
23. Manthaw J. A., Hager L. R. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. № 17. P. 9654—9659.
24. Andrawis A., Johnson K. A., Tien M. // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. № 3. P. 1195—1198.
25. Meerwein H. // Chem. Ber. 1956. V. 89. № 1. P. 209—221. № 7. P. 2060—2071.
26. Рогожин В. В., Кутузова Г. Д., Угарова Н. Н., Березин И. В. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. № 6. С. 794—803.
27. Закус Г. Ф. Синтез модельных соединений лигнина. Рига: Зинатне, 1980. С. 113.
28. Delmas M., Le Bigot J., Gaset A. // Tetrahedron Lett. 1980. V. 21. № 50. P. 4831—4834.
29. Adler E., Eriksoo T. // Acta chem. scand. 1955. V. 9. № 2. P. 341—342.
30. Физер Л., Физер М. // Реагенты для органического синтеза. М.: Мир, 1970. Т. 3. С. 459.

Поступила в редакцию  
24.VI.1988

## LIGNINASE MODELLING. WHAT IS THE DIFFERENCE BETWEEN LIGNINASE AND OTHER PEROXIDASES?

SHKROB A. M., LEVIT M. N.\*, ARCHAKOV A. I.\*\*

*Research Institute of Physico-Chemical Medicine; \*Institute of Chemical Physics  
Academy of Sciences of the USSR; \*\*Second Medical Institute, Moscow*

At pH  $\leq 5.5$  horseradish peroxidase catalyzes  $H_2O_2$ -supported oxidative cleavage of 3,4-dimethoxyhydrobenzoin into veratric and benzoic aldehydes. Formation of veratric aldehyde in oxidation of 1-(3,4-dimethoxyphenyl)-1,2-propanediol and veratryl alcohol proceeds much slower. Both compounds, however, as well as isomeric dimethoxybenzenes facilitate oxidation of 3,4-dimethoxyhydrobenzoin by functioning as electron carriers between the substrate and the enzyme. Thus horseradish peroxidase can function in acid media like ligninase (lignin peroxidase) from white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. In contrast to the latter, horseradish peroxidase cannot split many typical ligninase substrates, such as  $\beta$ -O-ethers and 3,4-dimethoxyphenylbenzylcarbinol.

The peroxidase-catalyzed reactions were compared with nonenzymatic oxidation of the same substrates by radical-anions  $SO_4^{\cdot-}$  both in aqueous and in water-free media. The results obtained suggest that water attacks the primary radical-cations generated from methoxyl-substituted aromatics at the first step of oxidation. The reaction resulting in demethylation effectively competes with C—C bond cleavage in radical-cations and/or with secondary oxidation.

We believe that the same competition is characteristic of peroxidase-catalyzed reactions. As a consequence, C—C bond cleavage is possible only in substrates whose radical-cations are particularly unstable. In ligninase demethylation appears to be prevented by effective shielding of the radical-cations in its active site and/or by a small interval between primary and secondary one-electron oxidations.

The rate of aldehyde production in  $SO_4^{\cdot-}$ -supported oxidation of lignin models in aqueous solutions is practically independent of pH. As the reaction is controlled by  $SO_4^{\cdot-}$ -generation, this result indicates the contribution of demethylation to be pH-independent. Thus the pH-sensitivity of peroxidase- and ligninase-catalyzed oxidation of lignin models reflects dissociation of some grouping(s) in the enzyme molecule rather than inherent properties of intermediate radical-cations.