

JERZY TROJANOWSKI

BIOGENEZA HUMUSU

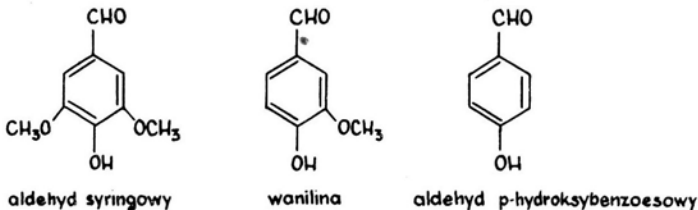
I. WSTĘP

W roku 1936 Waksman wysunął znaną hipotezę o lignoproteinowej budowie humusu. Udowodnienie tej hipotezy nastęrczało liczne trudności metodyczne, dotyczące zwłaszcza chemicznej charakterystyki i definicji ligniny i humusu.

Z dawniejszych metod wykorzystywano w tym celu nierozpuszczalność ligniny i humusu w kwasach, rozpuszczalność w alkaliach, reakcję utleniania, degradację do prostych związków fenolowych oraz analizę zawartości grup metoksyłowych i hydroksyłowych.

W nowszych czasach zastosowano z powodzeniem takie metody jak utlenianie nitrobenzenem oraz spektrofotometrię w podczerwieni. Wymienione metody stosuje się zarówno do badań analitycznych związków huminowych jak i ligniny.

Utlennianie ligniny z roślin wyższych nitrobenzenem powoduje powstawanie z niej aldehydu syringowego, waniliny i aldehydu o-hydroksybenzoesowego w różnych proporcjach (rys. 1).



Rys. 1. Produkty utleniania ligniny oraz kwasów huminowych nitrobenzenem w alkalicznym środowisku wg Morrisona (1958, 1963): I — aldehyd syringowy; II — wanilina; III — aldehyd p-hydroksybenzoesowy

Ze związków huminowych glebowych lub torfowych otrzymuje się przez ogrzewanie z nitrobenzenem te same aromatyczne metoksyaldehydy co i z ligniny (Bremer 1955, Morrison 1958, Morrison 1963). Świadczy to niewątpliwie o po-

krewności kwasów huminowych i ligniny. Wadą tej metody jest niska wydajność produktów (rzędu 1%).

Druga ze wspomnianych metod — spektrofotometria w podczerwieni, dostarcza głównie informacji o obecności grup karbonylowych, karboksylowych i hydroksylowych w makrocząsteczce ligniny lub humusu. Ponadto odzwierciedla budowę rdzenia cząsteczki ligniny bądź cząsteczek huminowych, które jak dotąd nie są dostępne dla badań innymi metodami chemicznymi. Struktura rdzenia znajduje swoje odbicie w pasmach absorpcji między 6 a 15 μ . Jak dotychczas nie zawsze umiemy interpretować te informacje w postaci określonych struktur chemicznych, jednak wykorzystujemy je do celów porównawczych, wykazując podobieństwo różnych materiałów huminowych i ligniny. Dawniej często stosowano analizę absorpcyjną w świetle ultrafioletowym. Absorpcja w ultrafiolecie daje tylko ograniczoną informację o obecności i stopniu koniugacji jednostek fenolowych w cząsteczce (Brauns 1960). Skoniugowane układy fenolowe wykazują w alkalicznym środowisku maksimum absorpcji przy 230 m μ , natomiast nieskoniugowane — przy 290 m μ w alkaliach i 280 m μ w kwasach.

II. PREKURSORY ZWIĄZKÓW HUMINOWYCH

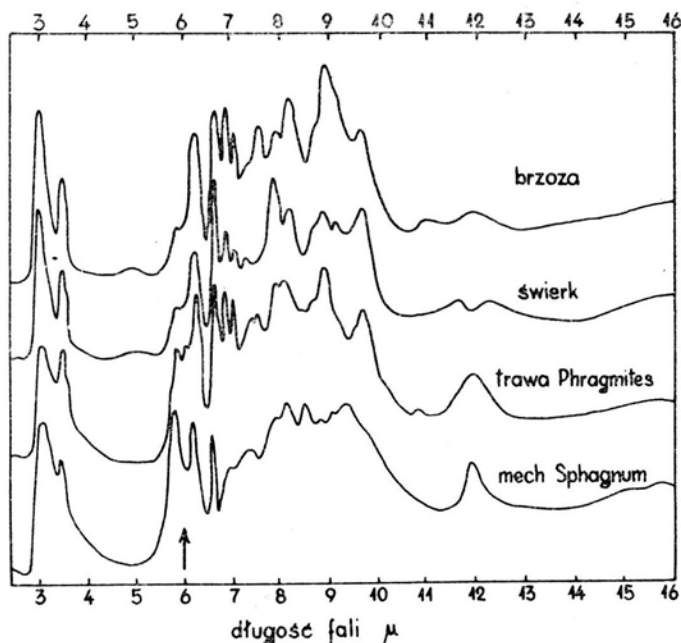
1. Lignina i związki pokrewne

Związki typu ligniny występują w różnych jednostkach systematycznych roślin i różnią się nieco pod względem budowy chemicznej. Np. lignina traw w znacznym stopniu jest rozpuszczalna w rozcieńczonych alkaliach, a przy utlenianiu nitrobenzenem daje dużą wydajność aldehydu p-hydroksybenzoesowego (Morrison 1963). Według Farmera i Morrisona (1964) widmo w podczerwieni dowodzi obecności w ligninie traw *Phragmites* grup karboksylowych (pasmo 4 μ i 5,88 μ) oraz podwójnych wiązań C=C (pasmo 6,04 μ). Wymienionych cech nie wykazuje natomiast lignina drzew iglastych. Natomiast część widma w podczerwieni położona w zakresie 6—15 μ wskazuje na znaczne podobieństwo budowy rdzenia cząsteczki ligniny drzewnej i pochodzącej z traw (rys. 2).

Jedną z wersji schematu struktury ligniny drzewnej podaje Brauns (1960). Cechą charakterystyczną budowy jest sieć wiązań eterowych oraz C—C, łącząca podjednostki metoksyfenylopropanowe w upakowaną ciasno strukturę przestrzenną. Tym tłumaczy się między innymi chemiczna stabilność ligniny.

U roślin niższych występują związki o zbliżonej budowie do ligniny.

U niektórych grzybów ciemno zabarwionych znajdowano do 50% masy związków ligninopodobnych, nierozpuszczalnych w stężonych kwasach, jednak o stosunkowo niskiej zawartości grup metoksyloowych (Cochrane 1958). Nic nie wiadomo bliższego o budowie tych związków, należy się jednak liczyć z możliwością wbudowywania ich w związki huminowe w warunkach naturalnych.



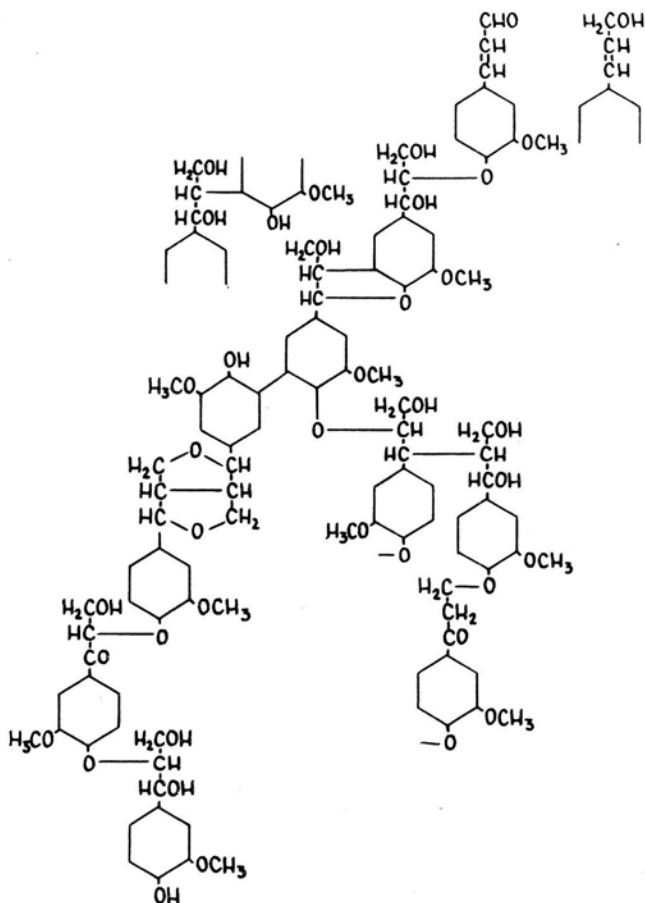
Rys. 2. Widma w podczerwieni ligniny wyekstrahowanej etanolem z brzozy i świerka, alkaliami z trawy *Phragmites* sp., oraz widmo sfagnolu wyekstrahowanego ze *Sphagnum* butanolem i H_2O (wg Farmera i Morrisona 1964)

Mchy i porosty z reguły zawierają w ścianie komórkowej związki fenolowe zbliżone do ligniny. Mchy z rodzaju *Sphagnum* zawierają substancję fenolową nazwaną sfagnolem, która może być wyekstrahowana z rośliny rozcieńczonymi alkaliami w autoklawie w temperaturze 140° (Czapek 1899). Według Farmera i Morrisona (1964) sfagnol zawiera znaczne ilości ugrupowań p-hydroksyfenolowych i domieszkę cukrów. Widmo w podczerwieni wykazuje obecność w sfagnolu struktur aromatycznych i fenolowych, lecz różni się od widma ligniny z roślin wyższych brakiem absorpcji w paśmie $6,85 \mu$ i $7,2 \mu$ charakterystycznego dla grup metoksyłowych. Poza tym sfagnol silnie absorbuje przy $5,9 \mu$, co przypisać można obecności licznych grup karboksylowych.

Sfagnol różni się zatem znacznie od ligniny z roślin wyższych.

2. Węglowodany jako prekursorzy humusu

Konowa i Aleksandrowa (1949) podają, że glebowe bakterie śluzowe po zhydrolizowaniu celulozy do glikozy utleniają tę ostatnią w 70% do CO_2 . Zatem tylko ok. 30% zhydrolizowanej celulozy po wbudowaniu, jako cukier do komórek bakteryjnych, mogłaby po ich śmierci wejść do procesu humifikacji.



Rys. 3. Schemat struktury ligniny drzewnej wg Braunsa (1962)

Zgodne z tym są wyniki nowszych prac Simonarta i współprac. (1959), którzy stwierdzili, że tylko ok. 10% radioaktywnego węgla z glikozy wprowadzonej do gleby jest inkorporowane do kwasów huminowych.

Oczywiście istnieje teoretyczna możliwość przekształcenia glikozy przez bakterie i grzyby w związki próchniczne np. według znanego schematu biosyntezy związków aromatycznych, który od glikozy prowadzi do kwasu szikimowego i fenylopirogonowego (Davis 1955).

Gdyby jednak przyjąć tworzenie się związków próchnicznych na tej drodze, trudno byłoby wyjaśnić, skąd biorą się w humusie grupy metoksyłowe.

Na obecnym etapie raczej wypada przyjąć, że węglowodany tylko w małym stopniu partycypują w biosyntezie humusu, którego głównym prekursorem jest lignina.

Od tego, dosyć powszechnie przyjętego poglądu, odbiega zdanie badaczy czechosłowackich, Tichego i współprac. (1962).

Badali oni rozkład lignoceluloz przez dwa gatunki z rodzaju *Fomes*, jeden gatunek *Poria* i jeden *Osmoporus*, rosnących na drewnie świerkowym lub bukowym. Autorzy twierdzą, że zdolność do nagromadzania brązowych substancji huminopodobnych posiadały tylko grzyby «zgnilizny brązowej», zaś gatunki rozkładające ligninę nie miały tej zdolności, mimo że wydzielają oksydazy polifenolowe.

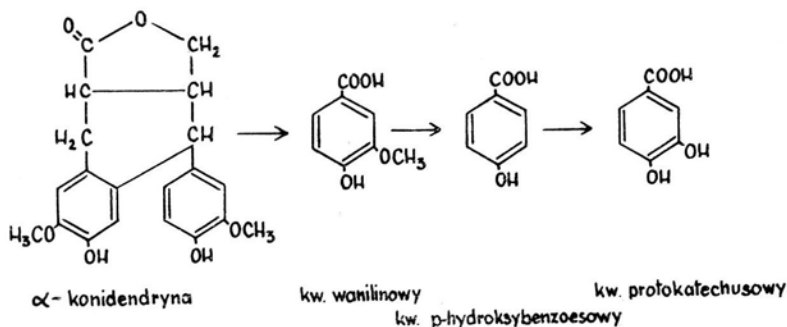
Grzyby «brunatnej zgnilizny» według dawnego poglądu Falcka (1926) rozkładają celulozę, lecz nie działają na ligninę. Według Röscha (1961) brązowienie ligniny pod wpływem grzybów «brunatnej zgnilizny» można wyjaśnić utlenianiem się ligniny w obecności lakazy, która jest obecna w grzybni i uwalnia się z niej przy obumieraniu grzybni. Rösch znalazł intracelularną lakazę w grzybach *Merulius lacrimans* i *Coniophora cerebella*.

Brązowienie ligniny w doświadczeniach Tichego można uważać zatem za objaw częściowego jej utleniania.

III. ORGANIZMY BIORĄCE UDZIAŁ W ROZKŁADZIE LIGNINY

Istotną rolę w biologicznym rozkładzie ligniny odgrywają niektóre rodzaje bakterii i grzybów.

Udowodniono zdolność *Flavobacterium* sp. (Konetzka 1957) i *Pseudomonas* sp. (Tabak 1959) do rozkładu lignanu α -konidendryny do kwasu wanilino-owego a nawet do kwasu p-hydroksybenzoesowego (rys. 4).



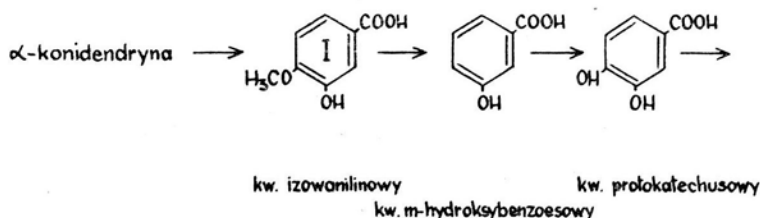
Rys. 4. Metabolizm α -konidendryny u niektórych gatunków *Flavobacterium* i *Pseudomonas* wg Konetzka (1957) i Tabak (1959)

Pani Sundman (1962) wykazała podobny szlak metabolizmu lignanów u *Pseudomonas* B i *Agrobacterium* sp. (rys. 5). Zdolne do rozkładu α -konidendryny bakterie wyodrębniła autorka z gleb; jeden z izolowanych gatunków — to prawdopodobnie *Agrobacterium radiobacter*.

Bakterie te rozkładają α -konidendrynę do kwasu izowanilinowego i dalej do kwasu protokatechusowego (Sundman 1962) a także są zdolne do utleniania związków fenolowych i rozrywania pierścienia aromatycznego (Sundman 1964).

W naturalnych populacjach mikroorganizmów biorących udział w rozkładzie ligniny drewna znaleźli Sundman i współprac. (1964) następujące rodzaje: *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Arthrobacterium*, *Mycobacterium* i *Brevibacterium*.

Grzyby o plechach nitkowatych usunięto z tej populacji przez wprowadzenie fungicydu — aktidionu.



Rys. 5. Metabolizm α -konidendryny u *Agrobacterium* sp. wg Sundman (1962)

Lepiej niż bakterie zbadano lignolityczne grzyby.

O możliwości biologicznej odbudowy ligniny przez grzyby donoszą już dawniejsze prace Waksmana i jego szkoły (1935, 1932) a także Falcka (1930), według którego główną rolę w tym procesie pełnią grzyby *Hymenomyetales*.

Stwierdzenie rozkładu ligniny w warunkach naturalnych w glebie jest dość trudnym zadaniem.

Dokładniejsze dane łatwiej można uzyskać w doświadczeniach modelowych. *Collybia butyracea* hodowana na martwych liściach lub szpilkach spowodowała według Lindeberga (1944) ubytek ligniny z tego materiału do 77% po 7 miesiącach. Według Fahrensusa i współprac. (1949) grzyby *Polyporus abietinus*, *Stereum rugosum* i *Marasmius scorodionius* mogą rozłożyć nawet do 80% ligniny w mączce drzewnej.

Według Flaiga (1958) po 410 dniach humifikacji słomy zaszczerpionej mikroflorą glebową w warunkach laboratoryjnych ubyło z tego materiału 96% holocelulozy i 63% ligniny.

W naszych badaniach z czystą ligniną Björkmana, inkubowaną przez 6 tygodni z grzybnią *Pholiota mutabilis*, stwierdziliśmy rozkład tej ligniny wyrażający się ubytkiem 42% masy wyjściowej (Trojanowski i Leonowicz 1963).

Preparat ligniny inkubowany przez Ishikawę i Schuberta (1963a) z grzybnią *Polyporus* sp. lub *Poria subacida* uległ rozkładowi po 13 dniach w 32 do 55% ilości wyjściowej.

Zdolność do rozkładu ligniny w ścianie martwej komórki roślinnej przez grzyby *Hymenomyetales* jest powszechnie uznawana za udowodnioną (Haider i wsp. 1964).

Nagromadziło się wiele dowodów na to, że lignina różnymi drogami może być przekształcona w związki huminowe. Np. Mayaudon i Simonart (1959) stwierdzili przy pomocy ^{14}C przechodzenie węgla ligniny w węgiel kwasów huminowych. Lignina była wprowadzona do gleby w postaci martwego materiału roślinnego.

Wieloletnie badania prowadzono nad przemianami ligniny w Instytucie Biochemii Gleby w Brunszwiku (Flaig 1958). Jako naturalnego źródła celulozy i ligniny używano słomy, którą poddawano humifikacji w warunkach kontrolowanych przy obecności mikroflory glebowej. Z badań tych wynika, że odbudowa ligniny przez naturalną populację mikroorganizmów wymaga obecności innego, poza ligniną, źródła węgla, np. celulozy. Podczas humifikacji stwierdzono znaczny spadek zawartości grup metoksylowych w ligninie ze słomy (z 15,3% do 7,32% po 410 dniach), powstawanie nowych grup karboksylowych, wzrost zawartości azotu aminowego z 0,54% do 3,14% po 260 dniach (Flaig i wsp. 1959). Równocześnie wzrastała ilość różnych typów aminokwasów, które można było wykazać chromatograficznie w hydrolizacie z humifikowanej ligniny.

W naszych nie publikowanych jeszcze doświadczeniach badaliśmy oddziaływanie grzybów na wyizolowaną ligninę. Po 6 tygodniach inkubacji preparatu ligniny Björkmana z grzybnią *Pholiota mutabilis*, wyizolowaliśmy z kultur i oczyścili pozostałą ligninę. Miała ona barwę brunatną, ilość metoksyli zmniejszyła się o 17%, ilość hydroksyli wzrosła o 20%, zaś widmo absorpcji światła podczerwonego wskazuje na poważne zmiany w strukturze.

W materiale, po inkubacji z grzybnią, stwierdzono, w porównaniu z ligniną wyjściową, wzrost absorpcji przy 6,6, 6,8 oraz 7,1 μ , tj. w rejonie ugrupowań fenolowych. Wzrosła również absorpcja przy 6,2 μ odpowiadająca strukturom charakterystycznym dla naturalnych związków huminowych. Zaznaczył się przyrost absorpcji przy 5,8 μ dowodzący obecności grup COOH. Przyrost absorpcji przy 6,1 μ wskazuje na wbudowanie azotu organicznego. Pasma 11,6 μ odzwierciedla wzrost zawartości układów aromatycznych. Absorpcja przy 7,1 μ , 7,9 oraz 8,9 μ jest charakterystyczna dla połączeń metoksylowych ligniny (rys. 6).

Powyższe wyniki wskazują na upodobnianie się pozostającego po ataku grzybów rdzenia cząsteczki ligniny do związków huminowych; jest to jeden z możliwych torów biogenezy humusu.

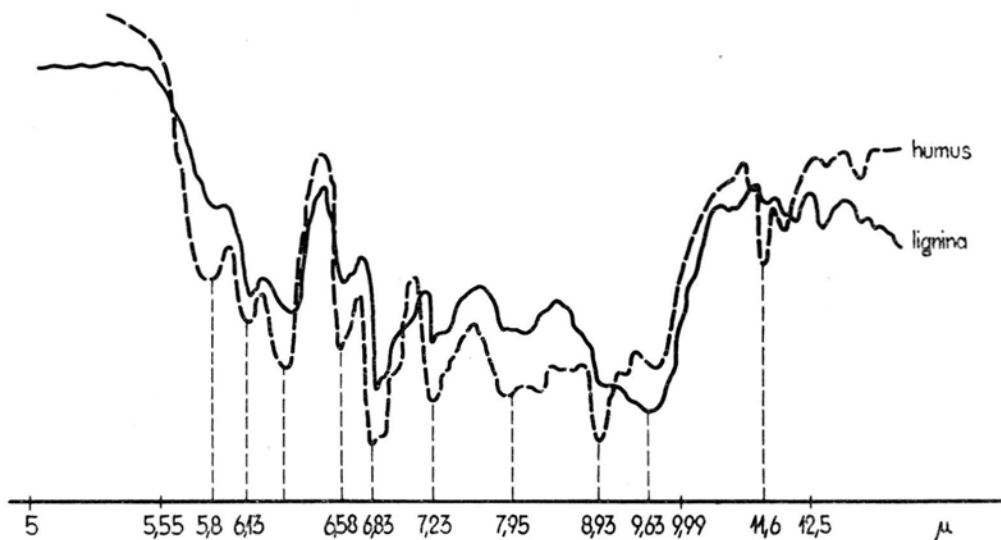
Istnieją zapewne i inne szlaki syntezy związków huminowych — na drodze polimeryzacji.

Dzisiaj jest rzeczą bezsporną, że niektóre grzyby *Basidiomycetes* mogą przy pomocy enzymów egzocelularnych rozkładać ligninę na podjednostki aromatyczne z różnymi podstawnikami (Henderson 1963, Ishikawa i wsp. 1963a).

Według badań tych autorów głównymi niskocząsteczkowymi produktami rozkładu ligniny przez grzyby tzw. «białej zgnilizny» należące do grupy *Hymenomycetales* są: aldehyd koniferylowy, aldehyd p-hydroksycynamonowy, kwas ferulowy, kwas 4-hydroksy-3-metoksy-fenylpirogronowy, kwas p-hydroksycynamonowy,

gwajacyloglicerol i jego eter beta-koniferylowy, wanilina i kwas wanilinowy. Autorzy zidentyfikowali chromatograficznie 15 związków fenolowych — produktów rozkładu ligniny.

Po inkubacji 1 g ligniny z grzybnią *Fomes fomentarius* po 28 dniach znaleźli Ishikawa i współprac. (1963a) 0,4—0,6 mg kwasu wanilinowego, tyleż kwasu p-hydroksybenzoesowego, 0,2—0,4 mg kwasu p-hydroksycynamonowego, 0,3—0,4 mg waniliny oraz mniejsze ilości innych monomerów i dimerów.



Rys. 6. Zmiany w widmie absorpcji światła podczerwonego w ligninie inkubowanej przez 6 tygodni z grzybnią *Pholiota mutabilis*. («humus» = lignina po inkubacji)

Myśkow (1963) zidentyfikował następujące produkty rozkładu biologicznego ligniny w warunkach laboratoryjnych: kwas syringowy, ferulowy, wanilinowy, cynamonowy, benzoesowy, wanilinę, aldehyd syringowy oraz benzaldehyd. Wydajność tych substancji wyniosła ok. 3%.

Badania powyższych autorów wykazują zatem dobrą zgodność tak co do ilości jak i typów niskocząsteczkowych produktów rozkładu ligniny.

Wymienione związki mogą być dalej metabolizowane przez grzyby.

Pani Henderson (1963) wykryła u izolowanych z gleb grzybów *Hormodendrum* sp. i *Haplographium* sp. następujące drogi metabolizmu związków ligninopochodnych.

1. Utlenianie aromatycznych aldehydów do odpowiednich kwasów (np. waniliny do kwasu wanilinowego).
2. Hydroksylacja pierścienia aromatycznego.
3. Zamiana grup metoksyłowych w związkach aromatycznych w grupy hydroksylowe — tj. powstawanie o-dwufenoli.

4. Skracanie 3-węglowego łańcucha bocznego drogą utleniania do grupy karbonylowej (np. kwas ferulowy do kwasu wanilinowego).

W rezultacie produkty biologicznego rozkładu ligniny przybierają formę prostych dwuhydroksylowych fenoli z podstawnikiem COOH lub łańcuchem trójwęglowym. Związki takie, jak dawniej udowodniono, łatwo ulegać mogą utlenianiu zarówno pod wpływem katalizatorów nieorganicznych (żel krzemionkowy) jak i oksydaz wydzielanych przez grzyby (lakaza, peroksydaza). Produkty te łatwo ulegać mogą polimeryzacji.

V. POCHODZENIE AZOTU HUMUSOWEGO

Azot, stanowiący do 3% masy kwasów huminowych, jest tam w znacznej mierze związany w postaci grup NH_2 aminokwasowych. Azot nieaminowy w rdzeniu makrocząsteczki kwasu huminowego jest trudno dostępny dla badań chemicznych.

Azot aminowy humusu jest pochodzenia białkowego. Wskazują na to badania Konowej i Aleksandrowej (1956), które wykazały duże podobieństwo składu aminokwasów humusu i przeciętnego białka.

W doświadczeniach laboratoryjnych Myśkova (1963) związki huminowe wytworzone z korzeni roślin motylkowych zawierały 50—75% azotu — NH_2 w stosunku do całkowitego N. Stwierdzona przez tegoż autora obecność glikozaminy oraz kwasu 2-aminopimelinowego świadczy, że azot aminowy związków huminowych może częściowo pochodzić z białka bakteryjnego.

Turczin i wsp. (1960) wprowadzili do środowiska humifikującej się słomy dodatek ciężkiego azotu w formie siarczanu amonu. Około połowy tego azotu nieorganicznego inkorporowało się do związków huminowych w postaci aminokwasów, co świadczy o pośrednictwie białka bakteryjnego lub grzybowego w procesie wbudowywania N w humus.

Mechanizm włączania azotu aminowego pochodzącego z aminokwasów białka roślinnego lub bakteryjnego można na gruncie fenolowej genezy humusu teoretycznie wyjaśnić ogólnie znanymi reakcjami addycji połączeń aminowych do o- lub p-chinonów. Zależnie od rodzaju podstawników w chinonach powstać mogą:

1. połączenia typu pierścień arom. — NH_2R
2. nowy pierścień heterocykliczny z azotem, skondensowany z aromatycznym (np. powstaje w ten sposób układ indolowy z DOPA-chinonu przy utlenianiu tyrozyny).

VI. DEMETOKSYLACJA LIGNINY

Ważny ten proces zasługuje na bardziej szczegółowe omówienie z uwagi na wielką rolę w biogenezie humusu.

W naturalnym procesie rozkładu ligniny zachodzą zmiany w zawartości grup $-\text{OCH}_3$. Dokładne określenie tych zmian przeprowadzili Flaig i wsp. (1959) w wa-

runkach laboratoryjnych; po 410 dniach humifikacji słomy z udziałem mikroflory glebowej zawartość grup metoksylowych ligniny obecnej w słomie zmalała o 55%.

Preparat ligniny natywnej po inkubacji z grzybami z rodzaju *Polyporus* lub *Poria* po 13 dniach zawiera do 50% mniej grup metoksylowych w stosunku do ilości wyjściowej, przy równoczesnym zwiększeniu się zawartości hydroksyli fenolowych (Ishikawa i wsp. 1963a).

Czysta lignina Björkmana inkubowana w naszej pracowni z grzybnią *Pholiota mutabilis* utraciła po 42 dniach ok. 17% grup metoksylowych (Trojanowski i Leonowicz 1963).

Metabolizm odszczepionych z ligniny grup metoksylowych nie jest znany.

Flaig i Haider (1964) piętnowali węglem ^{14}C grupy metoksyłowe w kwasie wanilinowym (związku modelowym ligniny) i stwierdzili, że grzyby rozkładające ligninę mają zdolność inkorporowania tego węgla do metioniny i seryny. Grupa metylowa, zdaniem tych autorów, jest po odszczepieniu z tego modelowego związku przekształcana w aldehyd mrówkowy, który częściowo w procesach oddychania zmieniany jest na CO_2 , a częściowo inkorporowany do wymienionych aminokwasów. Jest to oczywiście boczna droga syntezy tych aminokwasów, która jednak może mieć znaczenie dla grzybów, wykorzystujących węgiel z ligniny. Hipoteza ta pozostaje w zgodzie z obecnymi poglądami na metabolizm grup CH_3 u roślin i bakterii.

Procesy transmetylacji zdają się odgrywać istotną rolę w rozkładzie ligniny przez grzyby.

VI. MECHANIZM ENZYMATYCZNY PROCESU ROZKŁADU LIGNINY

W 1927 roku Bavendamm stwierdził, że rozkładające drewno grzyby hodowane na pożywkach stałych, zawierających kwas taninowy, wytwarzały naokoło *mycelium* ciemne obwódki. Według przypuszczenia Bavendamma zdolne do zabarwiania taniny grzyby *Hymenomyces* (tzw. «biała zgnilizna») wydzielają do środowiska egzoenzymy z grupy oksydaz fenolowych, katalizujące utlenianie taniny do ciemno zabarwionych produktów (Bavendamm 1927).

Zdaniem Lindeberga także grzyby glebowe, zdolne do rozkładania ligniny, wydzielają do środowiska egzoenzymy z grupy oksydaz fenolowych (Lindeberg 1948).

Grupa badaczy czeskosłowackich pod kierunkiem Rypačka potwierdziła na szerszym materiale słuszność reguły Bavendamma i Lindeberga o wydzielaniu fenolooksydaz przez grzyby rozkładające ligninę (Havličková i Rypaček 1957). Tichy i Schaniel (1957) przebadali 60 gatunków grzybów rozkładających drewno i stwierdzili wytwarzanie oksydaz w gatunkach zdolnych do rozkładania ligniny.

W świetle naszych nie publikowanych badań wydaje się, że jednak nie wszystkie grzyby zdolne do rozkładu ligniny wydzielają lakazę, u pewnych gatunków występuje tylko egzoenzym peroksydaza (*Xanthochrous pini*).

Pani Law (1950) zauważyła, że niektóre gatunki *Hymenomyces* wydzielają do środowiska oprócz lakazy także peroksydazę i katalazę. Egzoenzym peroksydazę znalazła autorka w kulturach *Polystictus versicolor*, *Ganoderma applanatum*, *Fomes robustus*, *Fomes rudis* i *Stereum hirsutum*. Egzo-katalazę znalazła u *Ganoderma applanatum*.

Ishikawa, Schubert i Nord (1963b) stwierdzili w mycelium *Fomes foetentarius* oraz w mycelium i pożywce po kulturze *Collybia velutipes* obecność peroksydazy oraz lakazy i tyrozynazy.

W naszej pracowni zidentyfikowaliśmy w różnych gatunkach *Hymenomyces* również peroksydazę, lakazę i katalazę.

W kulturze *Polystictus versicolor* wykryto dehydrogenazę alkoholi aromatycznych, katalizującą utlenianie alkoholi pierwszorzędowych (koniferylowego, wanilinowego i weratrowego) do odpowiednich aldehydów (Farmer, Henderson, Russel 1960).

Wymienione oksydazy katalizują utlenianie bardzo szerokiego wachlarza substratów. Udowodniono, że lakaza utlenia nie tylko dwuhydroksyfenole, fenole i aromatyczne aminy, lecz także metoksyfenole typu spotykanego w ligninie np. alkohol koniferylowy (Higuchi i wsp. 1955, Mason i Cronin 1955).

Jeszcze szerszy wachlarz substratów posiada peroksydaza mająca również zdolność utleniania metoksyfenolowych monomerów ligniny (Ishikawa, Schubert i Nord 1963b).

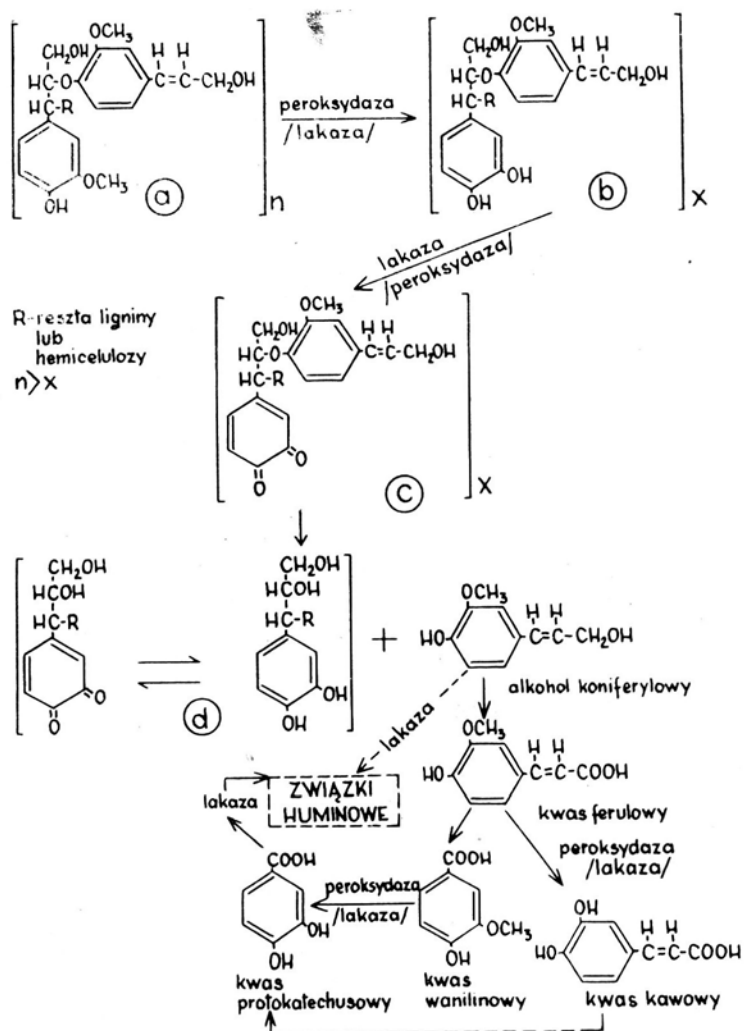
Rola lakazy i peroksydazy grzybowej w rozkładzie ligniny była przedmiotem nielicznych badań.

Pani Law (1959) uważa, że rola lakazy w tym procesie jest ograniczona do utleniania powstających niskocząsteczkowych produktów fenolowych.

Jednakże Fahraeus (1953) podaje, że czysta lignina inkubowana z lakazą pobiera tlen. Rola oksydaz w rozkładzie ligniny może być zatem szersza niż przypuszcza Law.

W naszej pracowni Leonowicz (1965) prowadził na kulturze grzyba *Pholiota mutabilis* badania przy zastosowaniu selektywnych inhibitorów lakazy i peroksydazy. Enzymy te są obecne w filtracie po hodowli mycelium tego grzyba, który powoduje demetoksylację kwasu wanilinowego i ligniny. Okazało się, że dodatek nadtlenu wodoru zwiększał wydatnie efekt demetoksylacji; hydroksylamina (inhibitor peroksydazy) + DIECA (inhibitor lakazy) powodują 100% inhibicję tego procesu. Wprowadzenie samego DIECA zmniejszało efekt demetoksylacji podobnie, jak sama hydroksylamina.

Filtrat po hodowli *Pholiota*, w którym zidentyfikowaliśmy peroksydazę, lakazę i katalazę, katalizuje nie tylko demetoksylację ale i depolimeryzację ligniny, wyrażającą się ubytkiem masy. Wprowadzenie ligniny do hodowli powodowało ok. 9-krotny wzrost aktywności specyficznej peroksydazy i ok. 2-krotny wzrost aktywności lakazy, wydzielanych przez grzybnię do pożywki. Wyodrębniona przez nas peroksydaza grzyba *Pholiota mutabilis*, o aktywności specyficznej 675 jedn. P. Z., katalizowała wydajnie demetoksylację ligniny i kwasu wanilinowego w obecności H_2O_2 . Również preparat handlowy peroksydazy z roślin wyższych ma zdolność



Rys. 7. Hipotetyczny schemat rozkładu ligniny wg Leonowicza i Trojanowskiego (1965). Objasnienia w tekście

katalizowania demetoksylacji kwasu wanilinowego do kwasu protokatechusowego, oraz kwasu ferulowego do kwasu kawowego. Produkty te zidentyfikowaliśmy chromatograficznie.

Po raz pierwszy udało się zatem w tych badaniach wykazać demetoksylację zw. metoksyfenolowych pod wpływem dobrze zdefiniowanego enzymu — peroksydazy.

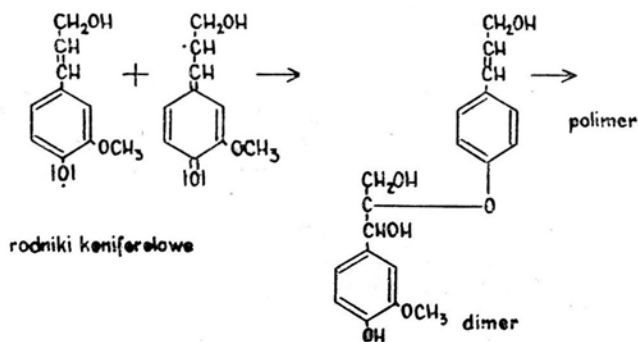
Na podstawie opisanych badań oraz danych z literatury wysunęliśmy hipotezę roboczą tłumaczącą rozkład biologiczny ligniny przez grzyby *Hymenomycetales*.

Według tej hipotezy, którą schematycznie przedstawia rys. 7, peroksydaza po-

woduje demetoksylację jednostek metoksyfenylopropanowych w makrocząsteczce ligniny (p. schemat 6 — wzory a i b).

Po demetoksylacji powstają ugrupowania o-dwufenolowe, na które może działać lakaza, powodując ich utlenianie do nietrwałych o-dwuchinonów, a prawdopodobnie tylko do semichinonów (reakcja b — c). Sąsiedztwo ugrupowania chinonowego lub semichinonowego wywiera efekt elektrofilny na elektrony wiązań eterowych łączących podjednostki fenylopropanowe ligniny. Następuje rozerwanie wiązania eterowego, przy czym jako produkty reakcji powstają: częściowo zdemetylowany rdzeń ligniny oraz fenylopropanowy monomer (reakcja c — d).

Monomery (np. alkohol ferulowy lub jego pochodne) mogą ulegać oksydatywnej polimeryzacji na związki huminowe pod wpływem lakazy, podobnie jak w opisanym przez Freudenberga schemacie polimeryzacji rodników koniferolowych (rys. 8). Utworzony eter gwajacylo-glicerolo-koniferylowy ma zdolność do dalszej



Rys. 8. Oksydacyjna polimeryzacja rodników, utworzonych pod wpływem lakazy z alkoholu koniferolowego, na eter gwajacyloglicerolokoniferylowy, wg Freudenberga (1956)

polimeryzacji nawet bez udziału enzymów (Freudenberg 1956). Można przypuścić, że w ten sposób tworzy się aromatyczny rdzeń prekursorów związków huminowych, które drogą dalszych reakcji utleniania, demetoksylacji i addycji aminokwasów przechodzić mogą w związki huminowe. Ten hipotetyczny mechanizm biosyntezy związków huminowych opiera się na analogii procesu biosyntezy ligniny w tkance roślinnej. W obu procesach istotą jest polimeryzacja podjednostek aromatycznych pod utleniającym wpływem oksydaz (lakazy).

Ze względu na trudności metodyczne nie wykryto dotychczas lakazy w glebie.

Trojanowski i Matwijów (1964) wykazali obecność lakazy w środowisku, w którym przebiegała modelowa humifikacja korzeni owsa, zaszczerpionych mikroflorą glebową, przy pH 5,5, w warunkach laboratoryjnych. Aktywność lakazy utrzymywała się przez 4 miesiące.

Przedstawiona hipotetyczna droga biogenezy humusu poprzez oksydacyjną syntezę polimerów nie wyklucza poglądu, że pewne frakcje próchnicy są tylko przekształconą (utlenioną i zdemetylowaną) ligniną, o czym wspominałem wyżej.

Niektóre frakcje próchnicy mogą być nadto pochodzenia węglowodanowego, choć jak wykazałem poprzednio, udział węglowodanów w biosyntezie humusu wydaje się odgrywać rolę drugorzędą w porównaniu z udziałem ligniny.

LITERATURA

- Bavendamm W., 1927: *Ber. Botan. Ges.*, 45, 357.
 Brauns F. E., Brauns D. A., 1960: *The Chemistry of Lignin*, Suppl. Vol. Acad. Press, New York.
 Bremner J. M., 1955: *Z. Pflernähr.*, 69, 32.
 Cochrane V. W., 1958: *Physiology of Fungi*, New York.
 Czapek F., 1899: *Flora*, 86, 361.
 Davis B. D., 1955: *Adv. Enzymol.*, 16, 247.
 Fähræus G., 1953: *Proc. IV. Intern. Congr. Microbiol.*, Roma 5, sec. XIV. 130.
 Fähræus G., Nilson R., Nilson G., 1949: *Svensk. Botan. Tid.*, 43, 343.
 Falck R., 1926: *Ber. deutsch. bot. Ges.*, 44, 652.
 Falck R., 1930: *Forstarch.*, 6, 366.
 Farmer V. C., Henderson M. E. K., Russel J. D., 1960: *Biochem. J.*, 74, 257.
 Farmer V. C., Morrison R. J., 1964: *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 28, 1537.
 Flaig W., 1958: *Fourth. Intern. Congress of Biochemistry*, London Pergamon Press, 2, 227.
 Flaig W., Haider K., 1964: *Estratto dagli Atti del V Simposio Internazionale di Agrochimica su «Lo zolfo in agricoltura»*, Palermo.
 Flaig W., Schobinger U., Deuel H., 1959: *Chem. Ber.*, 92, 1973.
 Freudenberg K., 1956: *Angew. Chemie*, 68, 508.
 Haider K., Lim S., Flaig W., 1964: *Holzforschung*, 18, 82.
 Havličková V., Rypáček V., 1957: *Česka mykologie*, 11, 96.
 Henderson M. E. K., 1963: *Pure and Applied Chemistry* 7, 589.
 Higuchi T., Kawamura J., Morimoto J., 1955: *Japan Forestry Soc.*, 37, 446.
 Ishikawa H., Schubert W. J., Nord F. F., 1963a: *Arch. Biochem. Biophys.*, 100, 131.
 Ishikawa H., Schubert W., Nord F. F., 1963b: *Biochem. Z.*, 338, 153.
 Konstzka W. A., Woodings E. T., Stove J., 1957: *Bacterial. Proc. (Soc. Am. Bact.)*, 135.
 Konowa M. M., Aleksandrowa J. W., 1949: *Mikrobiologija*, 18, 42.
 Konowa M. M., Aleksandrowa J. W., 1956: *Poczwowiedzenie*, 5, 86.
 Law K., 1950: *Ann. Bot.*, N. S., 14, 69.
 Law K., 1959: *Physiol. Plant.*, 12, 854.
 Leonowicz A., Trojanowski J., 1965: *Acta Microbiol. Polon.*, 14, 55.
 Leonowicz A., Trojanowski J., 1965: *Abstr. Comm. II Meeting FEBS*, Vienna A, 18.
 Lindeberg G., 1944: *Symbolae Botan. Uppsaliensis*, 8, 1.
 Lindeberg G., 1948: *Physiol. Plantarum*, 1, 196.
 Mason H. S., Cronyn H., 1955: *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 491.
 Mayandon J., Simonart P., 1959: *Plant and Soil*, 11, 181.
 Morrison R. J., 1958: *J. Soil Sci.*, 9, 130.
 Morrison R. J., 1963: *J. Soil Sci.*, 14, 201.
 Myśkow W., 1963: *Pamiętnik Puławski IUNG*, 11, 203.
 Myśkow W., 1964: *Postępy Nauk Rolniczych*, 1, 73.
 Rösch R., 1961: *Archiv für Mikrobiologie*, 38, 73.
 Simonart P., Mayandon J., Batistic L., 1959: *Plant and Soil*, 4, 176.
 Sundman V., 1962: *Finska Kemists Medd.*, 71, 26.
 Sundman V., 1964: *J. Gen. Microbiol.*, 36, 171.

- Sundman V., Kuusi T., Kuhanen S., Carlberg G., 1964: *Acta Agriculturae Scand.*, XIV, 4.
- Tabak H. H., Chambers C. W., Kabler P. W., 1959: *J. Bact.*, 78, 469.
- Tichý V., Četlová J., 1962: *Publ. Fac. Sci. Univ. J. E. Purkyne, Brno*, 436, 379.
- Tichý V., Schanel L., 1957: *Spisy přírodoved. fak. Mas. univ., Brno*, 388, 1.
- Trojanowski J., Leonowicz A., 1963: *Annales Univ. M. Curie-Skłodowska Sec. C.*, 18, 441.
- Trojanowski J., Matwijów J., 1964: *Roczniki Gleboznawcze*, 14 (Supplement), 45.
- Turczin F. B., Bersenjewa S. N., Korickaja J. A., 1960: *Transact. Intern. Congr. Soil. Sci., Madison, USA*, 2, 236.
- Waksman S. A., Hutchings J., 1935: *Soil Sci.*, 40, 347.
- Waksman S. A., Hutchings J., 1936: *Soil Sci.*, 42, 119.
- Waksman S. A., Nissen W., 1932: *Amer. J. Bot.*, 19, 514.