

УДК 579.2

ФЛАВИНЗАВИСИМЫЕ МОНООКСИГЕНАЗЫ ПУТЕЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ДЕГРАДАЦИИ *para*-ЗАМЕЩЕННЫХ ФЕНОЛОВ

© 2022 г. Н. В. Жарикова¹, *, В. В. Коробов¹, Е. Ю. Журенко¹

¹Уфимский институт биологии – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, 450054 Россия

*e-mail: puzzle111@yandex.ru

Поступила в редакцию 27.05.2022 г.

После доработки 27.06.2022 г.

Принята к публикации 04.07.2022 г.

Аэробная деградация хлорпроизводных фенола у бактерий происходит двумя основными путями и, в первую очередь, зависит от степени галогенированности субстрата. При конверсии моно- и дихлорфенолов наблюдается гидроксирование субстрата до соответствующего (хлор)катехола, после чего происходит *орто*-расщепление его ароматического кольца. Второй путь, в котором субстрат превращается через гидрохинон/гидроксигидрохинон или его хлорпроизводные в малеилацетат и далее в β -кетоадипат, характерен для бактерий, метаболизирующих полигалогенированные фенолы. Большинство исследований сосредоточено на организмах и путях, которые связаны с деградацией (хлор)ароматических субстратов через катехолы, в то время как альтернативный путь гидрохинона остается слабо описанным. В обзоре представлена информация по путям метаболизма *para*-замещенных хлорфенолов, где особое внимание уделяется флавинзависимым монооксигеназам, катализирующим первичные реакции окисления субстратов.

Ключевые слова: флавинзависимая монооксигеназа, биодеградация, 4-хлорфенол, 2,4,5-трихлорфенол, 2,4,6-трихлорфенол, пентахлорфенол, гидрохинон, гидроксигидрохинон

DOI: 10.31857/S0555109922060174

Хлорфенолы – синтетические органические соединения, получаемые в крупных промышленных и коммерческих масштабах путем хлорирования фенола или гидролиза хлорбензолов. Как побочные продукты они образуются при хлорировании питьевой воды, в процессе коксования угля, во время отбеливания при производстве бумаги, а также в качестве интермедиатов на некоторых стадиях производства хлорфеноксисукусных гербицидов. Смеси хлорфенолов, благодаря их фунгицидным и бактерицидным свойствам, широко используются в качестве антисептиков, пропиток для дерева и кожи, а также химикатов для защиты растений. Соединения этой группы могут образовываться в результате естественных реакций в почвах и поверхностных водах при хлорировании гуминовой кислоты и фенолов хлорпероксидазами некоторых бактерий и грибов. Другими природными источниками хлорфенолов в окружающей среде являются процессы неполного биоразложения пестицидов и гербицидов, в том числе 2,4,5-трихлорфеноксисукусной (2,4,5-Т) и 2,4-дихлорфеноксисукусной (2,4-Д) кислот. Для удаления хлорфенолов используются физико-химические и биологические методы, при этом полная бактериальная деграда-

ция считается экономичным и экологически чистым методом очистки окружающей среды [1–3].

До настоящего времени в литературе описаны два основных метаболических пути аэробной деградации галогенированных фенолов. У бактерий, которые разлагают моно- и дихлорфенолы, наблюдается путь разложения, в котором замещенный фенол гидроксигируется до соответствующего катехола, после чего происходит *орто*-расщепление его ароматического кольца. Хотя было показано, что встречаются пути продуктивного *мета*-расщепления, большинство известных штаммов используют именно модифицированный *орто*-путь. При этом атомы хлора из молекулы ароматического субстрата удаляются уже после раскрытия ароматического кольца [3]. С другой стороны, были обнаружены пути биодеградации, главным образом у бактерий, растущих на полигалогенированных фенолах, в которых хлор в *para*-положении замещается гидроксильной группой с образованием гидрохинона или его производных [2, 4–7]. При этом один или несколько атомов хлора элиминируются из молекулы субстрата до раскрытия ароматического кольца. Исключением из этого правила является метаболизм монохлорфенола, замещенного

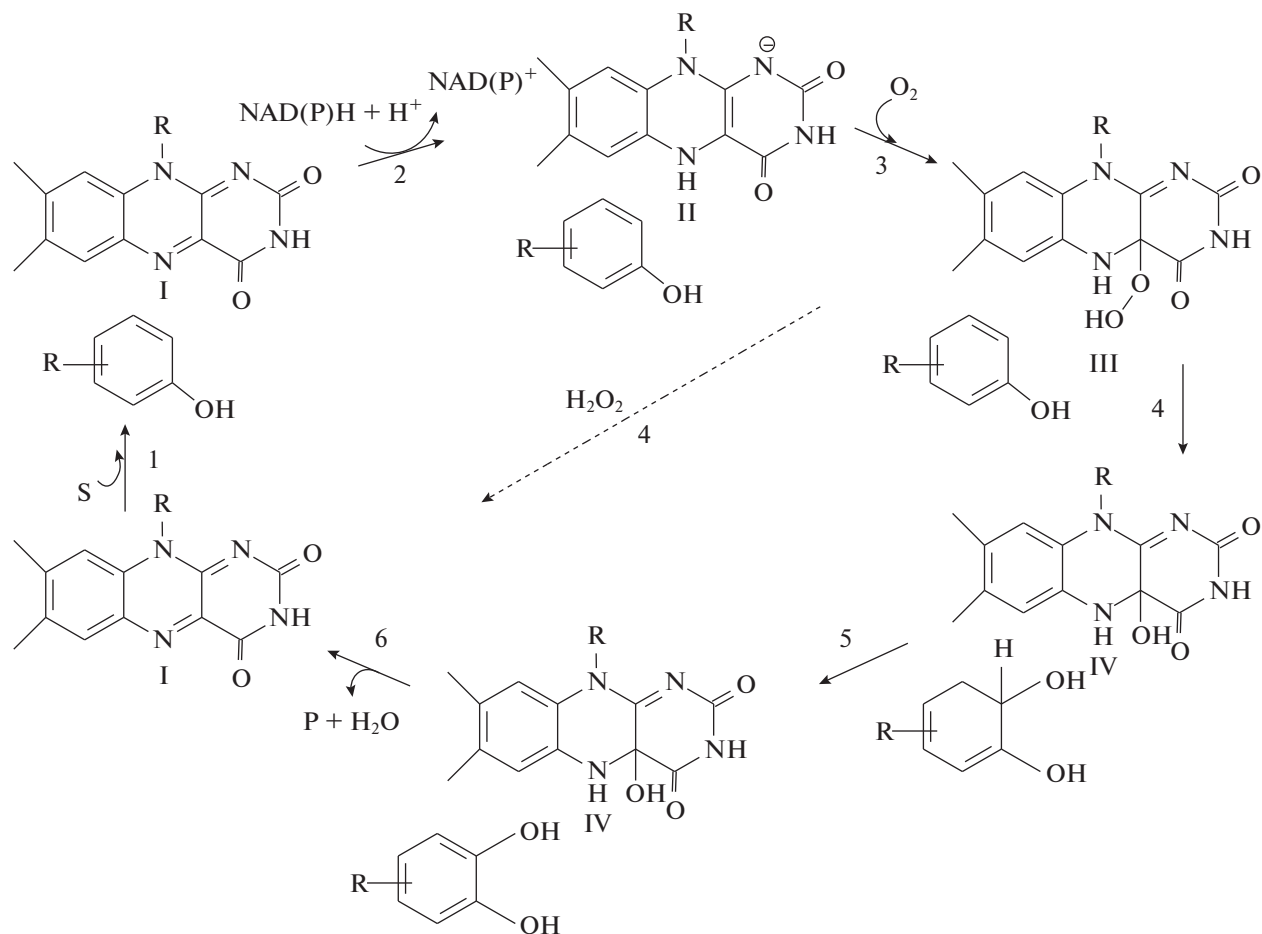


Рис. 1. Типичный каталитический цикл гидроксилирования фенолов, катализируемый флавиновыми монооксигеназами (гидроксилазами) [9]. I – окисленный флавин, II – восстановленный флавин, III – C4a-гидропероксифлавин, IV – C4a-гидроксиламин, S – субстрат, P – продукт, 1–5 – стадии каталитического цикла. 1–7 – пути действия фермента.

в *para*-положении, который протекает по пути гидрохинона, а не хлоркатехола [8].

Монооксигенирование ароматического субстрата, имеющего хлор-заместитель в *para*-положении, приводит к одновременному гидроксилированию и дегалогенированию, в результате которого образуется гидрохинон или его производные. Такое окислительно-дегалогенирование катализируют флавиновыми монооксигеназами, замещающие хлор гидроксильной группой, атом кислорода которой происходит из O_2 . Флавиновыми монооксигеназами (гидроксилазами) (КФ 1.14.13), рассматриваемые в данном обзоре, используют в качестве кофактора флавин и требуют для его восстановления НАДН или НАДФН (рис. 1, стадия 2). Восстановленный флавин реагирует с молекулярным кислородом с образованием промежуточного соединения C4a-гидропероксифлавина (стадия 3), который является активной формой флавина – ключевого промежуточного соединения всех флавиновыми монооксигеназ. Действуя как электрофил, этот

интермедиат встраивает гидроксильную группу в ароматические субстраты, в результате чего образуется гидроксилированный продукт и C4a-гидроксиламин (стадия 4, 5). Последний затем дегидратируется до первоначального окисленного флавина (стадия 6). В отсутствие фенольного субстрата промежуточное соединение C4a-гидропероксифламин отщепляет H_2O_2 , чтобы вернуться к первоначальному окисленному флавину (стадия 7) [9–11].

Все флавиновыми гидроксилазы по количеству белковых компонентов, участвующих в реакции, могут быть разделены на две группы: одно- и двухкомпонентные монооксигеназы. Однокомпонентные ферменты (класс А) катализируют восстановление флавина и окисление субстратов в одной и той же единственной полипептидной цепи, тогда как эти реакции у двухкомпонентных флавиновыми монооксигеназ (класс D) происходят в двух отдельных белках: восстановление флавина происходит в активном центре компонен-

та редуктазы, а оксигенация субстрата – в активном центре компонента оксигеназы. Хотя однокомпонентные и двухкомпонентные монооксигеназы катализируют аналогичные реакции гидроксирования фенольных соединений, между этими двумя типами ферментов есть некоторые отличия, диктуемые их строением. Так, у однокомпонентных монооксигеназ флаavin (причем исключительно ФАД) – это простетическая группа, прочно связанная с белком, в то время как у двухкомпонентных флаavin (может быть ФАД, ФМН, рибофлаavin), легко диффундируя между компонентами, действует скорее как косубстрат. Первая стадия рис. 1, в которой происходит связывание окисленного флавина с субстратом, характерна больше для однокомпонентных монооксигеназ [9–11].

Монооксигенирование ароматического соединения, имеющего электроноакцепторный *n*-заместитель, такой как нитро-группа или хлор, по сравнению с незамещенным субстратом имеет свои особенности. Атака монооксигеназы на ароматическое кольцо в незамещенном положении приводит к образованию хинолов, а в положении, занимаемом электроноакцепторной группой – хинонов (рис. 2).

Ароматический субстрат, имеющий электроноакцепторный *n*-заместитель, может метаболизироваться аэробными бактериями двумя путями, которые коррелируют с типом использованной монооксигеназы и, в меньшей степени, с таксономической принадлежностью деструктора.

У грамотрицательных бактерий преимущественно однокомпонентные флаavinзависимые монооксигеназы с одновременным выделением ионов электроноакцепторного *n*-заместителя преобразуют *n*-замещенный фенол через *n*-бензохинон (ПБХ) в гидрохинон (ГХ), который затем подвергается *мета*-расщеплению [13–16]. Второй путь встречается в основном у грамположительных бактерий, где деградация первоначального субстрата в результате активности двухкомпонентных флаavinзависимых монооксигеназ происходит через образование 2-гидрокси-*n*-бензохинона, с последующим его восстановлением до гидросигидрохинона (ГГХ), бензойное кольцо которого затем раскрывается в *орто*-позиции [17–21].

До настоящего момента большинство исследований сосредоточено на организмах и путях, которые связаны с деградацией (хлор)ароматических субстратов через катехолы, в то время как альтернативные пути гидрохинона остаются слабо описанными. В обзоре представлена информация по путям метаболизма *пара*-замещенных хлорфенолов, где особое внимание уделяется флаavinзависимым монооксигеназам, катализирующим первичные реакции окисления субстратов. Вопросы образования хлоркатехола и дальнейшего

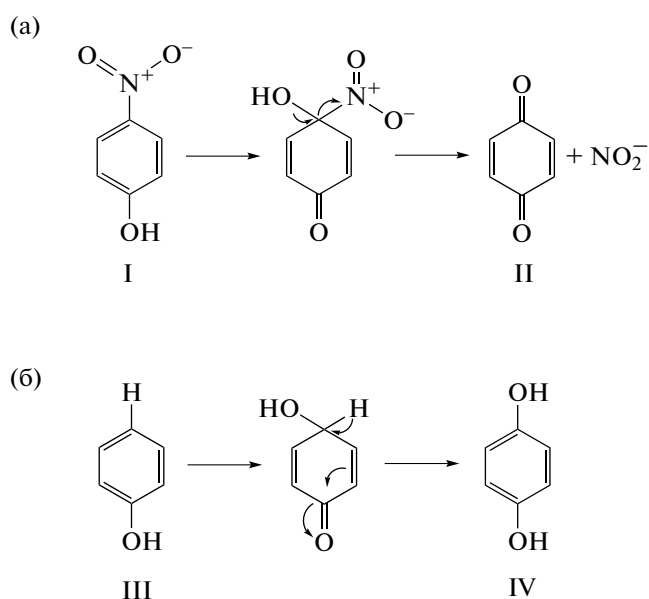


Рис. 2. Превращение гипотетических интермедиатов монооксигеназной реакции [12]: а – атака монооксигеназой по сайту, занятому электроноакцепторным заместителем; б – монооксигеназа атакует сайт, занятый электронодонорным заместителем: I – 4-нитрофенол, II – *пара*-бензохинон, III – фенол, IV – гидрохинон.

расщепления по модифицированному *орто*-пути остаются за рамками данного обзора.

КОНВЕРСИЯ 4-ХЛОРФЕНОЛА КАК ЧАСТНЫЙ СЛУЧАЙ ПУТИ ДЕГРАДАЦИИ *пара*-ЗАМЕЩЕННЫХ ФЕНОЛОВ

Монохлорфенолы представляют собой простейшую форму хлорированных фенолов и содержат только один атом хлор заместителя в бензойном кольце. 4-Хлорфенол (4-ХФ) широко используется в качестве антисептика для домашнего, больничного и сельскохозяйственного применения. Кроме того он может поступать в окружающую среду и естественным путем в результате деятельности бактерий, грибов и насекомых [2, 3].

В аэробных условиях успешная минерализация монозамещенных в *мета* и *орто* положениях хлорфенолов бактериями обычно осуществляется путем их первоначального окисления до 3- или 4-хлоркатехолов с последующим раскрытием ароматического кольца в *орто*-положении. Хлор в результате спонтанно удаляется, а углеродный скелет превращается в продукты, которые ассимилируются в центральном метаболизме клетки. Иначе обстоит дело, с конверсией монохлорфенола, замещенного в *пара*-положении [3, 22, 23].

Монооксигенирование фенолов, имеющих электроноакцепторный *n*-заместитель, такой как

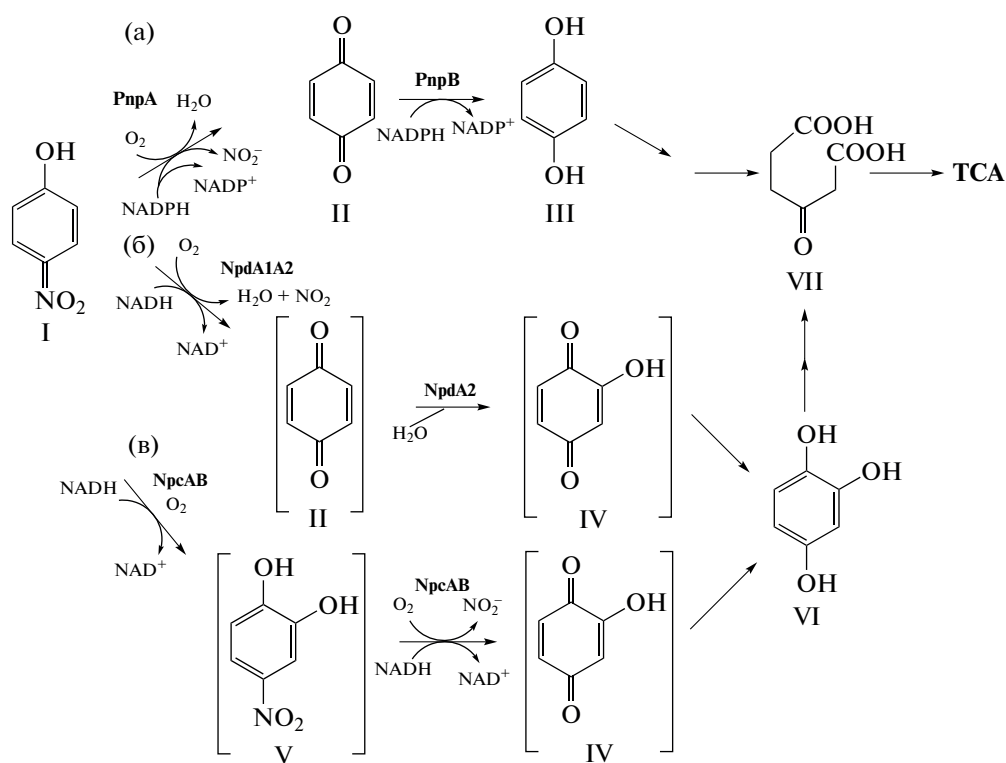


Рис. 3. Альтернативные пути деградации 4-НФ с ферментами, ответственными за стадию инициации у штаммов *Pseudomonas* sp. WBC-3 (а); *Arthrobacter* sp. JS443 (б); *R. opacus* SAO101 (в). I – 4-нитрофенол, II – *para*-бензохинон, III – гидрохинон, VI – 2-гидрокси-1,4-бензохинон; V – 4-нитрокатехол, VI – гидросигидрохинон, VII – β-кетоадипат, TCA – цикл трикарбоновых кислот [12].

хлор, приводит к одновременному гидроксилированию и дегалогенированию. При этом в результате проявления монооксигеназной активности сначала образуется промежуточный хинон, который затем восстанавливается. В зависимости от того, что служит субстратом для диоксигеназ, расщепляющих ароматическое кольцо ГХ или ГГХ, различают два альтернативных пути. Преимущественно у грамположительных бактерий, таких как *Bacillus* spp., *Rhodococcus* spp. и *Arthrobacter* spp., деградация первоначального субстрата происходит через образование ГГХ [17–21]. Монооксигеназы, ответственные за эту трансформацию, принадлежат к семейству двухкомпонентных флавинзависимых монооксигеназ [12, 18, 19, 24], так называемое TC-FDM-семейство [25]. Бензойное кольцо ГГХ затем расщепляется с образованием МА и далее β-кетоадипата. Второй путь встречается в основном у грамотрицательных бактерий, например у штаммов рода *Pseudomonas*, и инициируется однокомпонентной монооксигеназой [13–16], которая, преобразует *para*-замещенный фенол в ГХ. Бензойное кольцо последнего расщепляется с образованием γ-гидроксимуконического полуальдегида, который трансформируется до малеата, а затем до β-кетоадипата [16, 26].

Поскольку многие бактериальные деструкторы способны к расщеплению нескольких фенольных субстратов, имеющих электроноакцепторный заместитель, рассмотрим деградацию *para*-замещенных фенолов сначала на примере *para*-нитрофенола (4-НФ), биохимический и генетический аспекты которого достаточно хорошо известны. Аэробная конверсия 4-НФ может осуществляться бактериями как через ГХ, так и ГГХ, причем последний путь имеет два варианта (рис. 3).

Как видно из рис. 3, в результате проявления активности однокомпонентной 4-нитрофенол-4-монооксигеназы (КФ 1.14.13.167) PnpA штамма *Pseudomonas* sp. WBC-3 происходит трансформация 4-НФ до ПБХ [13]. Затем редуктаза PnpB (КФ 1.6.5.6) восстанавливает ПБХ до ГХ, бензойное кольцо которого расщепляется в следующей реакции. Классический ГХ-путь, катализируемый однокомпонентными гидроксилазами, описан также для штаммов *Moraxella* sp. [27], *Pseudomonas* sp. NyZ402 [28] и *Pseudomonas* sp. 1-7 [14].

Две грамположительные культуры *Arthrobacter* sp. JS443 [12] и *Rhodococcus opacus* SAO101 [18] метаболизуют 4-НФ до ГГХ под действием двухкомпонентных монооксигеназ NpdA1A2 (КФ 1.14.13.167) и NpcAB (КФ 1.14.13.29). После расщепления кольца и образования β-кетоадипата

метаболиты обоих альтернативных путей поступают в ЦТК.

Интересно, что для штамма *Pseudomonas* sp. 1-7 был выявлен побочный ГГХ-путь через 4-нитрокатехол (4-НК), причем в кластере генов деградации 4-НФ *pdcABDEFG* не было обнаружено гена специфичной двухкомпонентной монооксигеназы, катализирующей образование ГГХ. Вероятно, однокомпонентная монооксигеназа *PdcA* способна катализировать трансформации 4-НФ как до ПБХ, так и до 4-НК [14]. При исследовании другого штамма *Pseudomonas* sp. WBC-3 обнаружили, что очищенная однокомпонентная 4-нитрофенол-4-монооксигеназа (*PnpA*) трансформировала 4-НК в ГГХ, что является первым случаем такого катализа для однокомпонентных монооксигеназ. Штамм WBC-3 фактически не мог расти на 4-НК, однако был способен полностью разлагать как 4-НФ, так и 4-НК, когда 4-НФ использовался в качестве индуктора [15]. Гены деградации 4-НФ *pnpABCDEF* штамма WBC-3 показали высокое сходство с кластером *pdcABCDEF* штамма 1-7, что предполагает одинаковый механизм проявления активности однокомпонентных монооксигеназ этих двух культур.

Генетические детерминанты деградации 4-НФ были идентифицированы для ГХ- и ГГХ-путей в нескольких географически отдаленных изолятах, включая *R. opacus* SAO101 [18], *Arthrobacter* sp. JS443 [12] и *Pseudomonas* sp. штаммы WBC-3, 1-7 и NyZ402 [13, 15, 28]. С одной стороны, последовательности генов являются консервативными для каждого пути, поскольку были обнаружены высокие уровни их сходства между кластерами деградации из штаммов SAO101 и JS443, а также между штаммами WBC-3, 1-7 и NyZ402. С другой стороны, как последовательности генов, так и их организация значительно различались у ГГХ- и ГХ-путей, что подразумевало их различное происхождение [15, 28].

4-ХФ по пути гидрохинона способны метаболизировать несколько штаммов-деструкторов, принадлежащих к группе актинобактерий, в том числе: *Arthrobacter* sp. JS443 [12], *Arthrobacter ureafaciens* CPR706 [29], *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 [8], *Nocardioides* sp. NSP41 [30]. Еще одна актинобактерия *Arthrobacter* sp. IF1 осуществляет конверсию другого фенола, галогенированного в *пара*-положении – 4-фторфенола (4-ФФ) (рис. 4) [31].

Установлено, что конверсия соответствующих *n*-галогенфенолов актинобактериями *Nocardioides* sp. NSP41, *A. ureafaciens* CPR706, *A. chlorophenolicus* A6 и *Arthrobacter* sp. IF1 идет через ГХ. У первого штамма дальнейший метаболизм не описан, а по культуре CPR706 имеются данные, основанные на анализе ферментативной активности. Эксперименты с неочищенными 4-ХФ-ин-

дуцированными клеточными экстрактами показали отсутствие 4-хлоркатехол- или катехолдиоксигеназной активностей. В то же время, гидрохинон трансформировался в промежуточное соединение с УФ-спектром, аналогичным 4-гидроксиумуковому полуальдегиду [29]. В данном случае, несмотря на то, что для грамположительных бактерий такой путь нехарактерен, деградация 4-ХФ у штамма CPR706 идет через гидрохинон с последующим расщеплением его ароматического кольца (рис. 4).

У штаммов *A. chlorophenolicus* A6 и *Arthrobacter* sp. IF1 ГХ гидроксилируется до ГГХ [31]. Хлоркатехольный путь был исключен для этих культур экспериментами с бесклеточными экстрактами, выращенных на 4-ХФ и 4-ФФ бактерий соответственно, которые не выявили активности катехол-1,2-диоксигеназы. Присутствия 4-хлоркатехолдиоксигеназы (для штамма A6), катехол-2,3-диоксигеназы и 4-фторкатехолдиоксигеназы (для штамма IF1) также не было обнаружено. Следовательно, у штаммов A6 и IF1 не реализуется классический метаболизм замещенного катехола путем его *ortho*-расщепления. Для штамма IF1 также была исключена возможность *meta*-расщепления 4-фторкатехола [8, 31].

При спектрофотометрическом контроле реакций из клеточных экстрактов культур A6 и IF1, индуцированных соответствующими *n*-галогенфенолами, типичный для ГГХ пик при 287 нм замещался пиком при 245 нм, который характерен для МА, что указывает на участие ГГХ-диоксигеназы, которая превращает ГГХ через МА в β -кетoadипат (рис. 4) [8, 31].

В эксперименте с 2,2'-дипиридилем, ингибитором диоксигеназ, расщепляющих ароматическое кольцо [32], подтвердилось, что именно ГГХ является субстратом для раскрытия кольца при разложении 4-ХФ у штамма A6. Растущая на 4-ХФ культура через несколько минут после добавления 2,2'-дипиридила меняла цвет и, в конце концов, становилась темно-красной, что указывало на накопление ГГХ в условиях хелатирования железа, при которых ингибируется фермент, расщепляющий ароматическое кольцо [8]. В то же время клетки культуры IF1, выращенные на ГГХ, показали полную конверсию этого соединения, как в присутствии, так и в отсутствие 2,2'-дипиридила, следовательно, предполагаемая ГГХ-оксигеназа не нуждалась в активных ионах железа, поэтому дальнейшее окисление этого соединения не ингибировалось хелатообразователем [31].

По-видимому, конверсия *n*-галогенфенолов у штаммов A6 и IF1 идет по пути ГГХ, поскольку именно последний является субстратом для диоксигеназ, расщепляющих ароматическое кольцо (рис. 4) [8, 31].

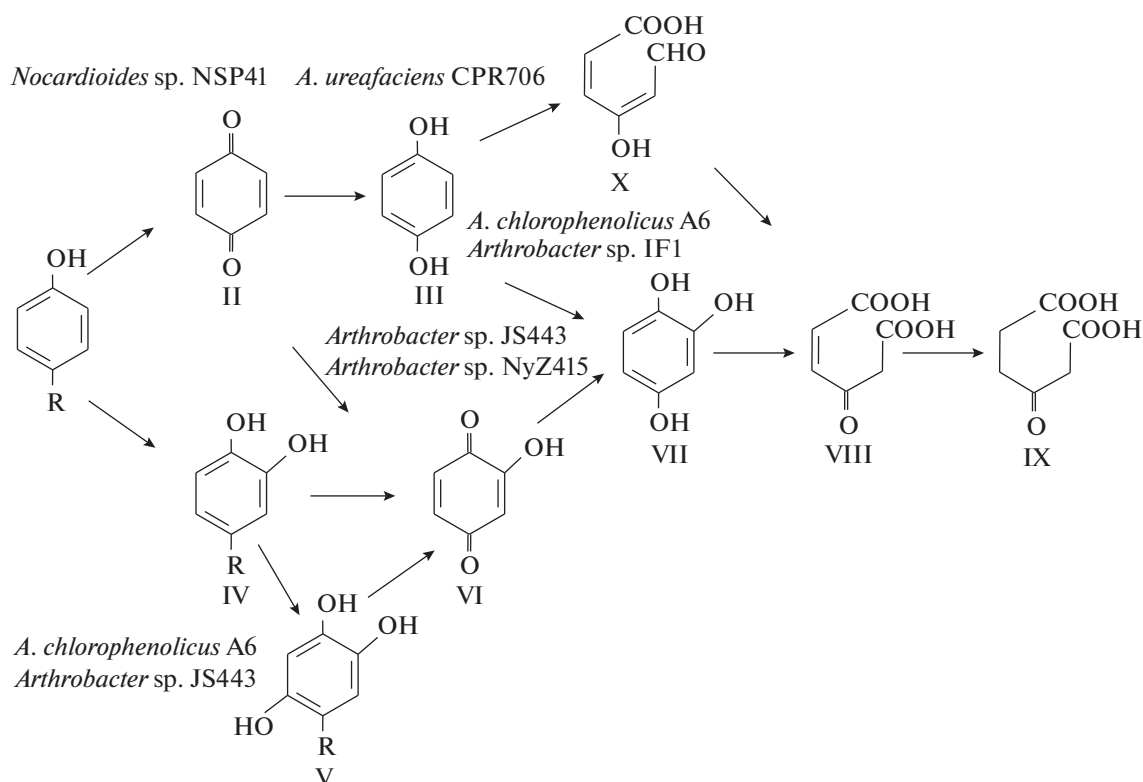


Рис. 4. Пути конверсии фенолов, галогенированных в *para*-положении у бактерий [8, 13, 27, 29, 31]: I – *para*-замещенный галогенфенол, II – *para*-бензохинон, III – гидрохинон, IV – *para*-замещенный катехол, V – замещенный в 5-м положении гидроксигидрохинон, VI – 2-гидрокси-1,4-бензохинон; VII – гидроксигидрохинон, VIII – малеилацетат, IX – β -кетoadипат, X – гидроксимуконовый полуальдегид. R – электроноакцепторный заместитель.

Необходимо отметить, что из бесклеточных экстрактов штамма А6, выращенных на сукцинате, удаление ГГХ не происходило. Тогда как в бесклеточных экстрактах штамма IF1, выращенного на глюкозе, наблюдалось лишь падение активности ГГХ-диоксигеназы (0.156 ед./мг) по сравнению с 4-ФФ-индуцированными бесклеточными экстрактами (0.195 ед./мг). Таким образом, только у штамма А6 наблюдалась явная индукция конверсии ГГХ, когда 4-ХФ являлся субстратом для роста вместо альтернативного субстрата [8, 31].

Для культуры А6 были идентифицированы еще два потенциальных метаболита конверсии 4-ХФ, а именно: 4-хлоркатехол (4-ХК) и 5-хлоргидрокси-гидрохинон (5-ХГГХ). Вероятно, по аналогии с 4-НК, они являются метаболитами альтернативной ветви пути (рис. 3, 4). Хотя *A. chlorophenolicus* А6 разлагает 4-ХК приблизительно в два раза медленнее, чем гидрохинон, все же альтернативный путь значительно способствует деградации 4-ХФ [8]. Интересно, что продуктами действия монооксигеназы NpdA2 штамма JS443 на 4-хлоркатехол, когда он использовался в качестве субстрата, также оказались ГГХ и 5-ХГГХ. Поскольку штаммы *A. chlorophenolicus* А6 и *Arthrobacter* sp. JS443 способны конвертировать как 4-НФ, так и 4-ХФ,

вероятно у обоих штаммов для деструкции этих соединений используется одна и та же ферментная система, что было подтверждено сравнением генов конверсии *para*-замещенных фенолов этих двух культур.

Гены деградации 4-ХФ (*cph*-гены) у штамма *A. chlorophenolicus* А6 распределены по двум кластерам – *cph I* и *cph II*, которые разделены псевдогеном резольвазы. Оказалось, что кластер I ответственен за катаболизм 4-ХФ, так как инсерционный мутант по гену *cphA-I* накапливает ГГХ и не способен расти на 4-ХФ [8]. Данный кластер имеет почти одинаковую организацию и на 80.5% идентичен кластеру генов *npd*, кодирующего ферменты катаболического пути 4-НФ штамма *Arthrobacter* sp. JS443 [12].

В кластеры *cph I* и *npd* входят гены монооксигеназ (*cphC-I* и *npdA2*), аминокислотные последовательности которых идентичны на 96%, что предполагает одинаковый механизм их действия. Монооксигеназы CphC-I и NpdA2 являются компонентами TC-FDM-семейства, отвечающими за окисление субстрата. Скорее всего, эти ферменты обладают слабой позиционной специфичностью в отношении 4-хлоркатехола, и гидроксилируют его в *para*-позиции по отношению к любой из

двух его гидроксильных групп, вследствие чего и образуются ГГХ и 5-ХГГХ [12].

Гены второго компонента ферментов ТС-FDM-семейства – НАДН-зависимых флавинредуктаз (*cphB* и *npdA1*), а также ГГХ 1,2-диоксигеназ (*cphA-I* и *npdB*) (КФ 1.13.11.37) и МА-редуктаз (КФ 1.3.1.32) (*npdC* и *cphF-I*) также были локализованы в кластерах *cph I*, и *npd* [8, 12]. Идентичность продуктов трех ключевых генов *npdB*, *npdA1* и *npdA2* штамма А6 была подтверждена путем их независимой экспрессии в клетках *Escherichia coli*.

Таким образом, аэробная конверсия *n*-хлорфенола для рассмотренных выше актинобактерий идет по ГГХ-пути и инициируется двухкомпонентными флавинзависимыми монооксигеназами с широкой субстратной специфичностью.

ВАРИАНТЫ МОНООКСИГЕНАЗНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ТРИХЛОРФЕНОЛОВ

2,4,5- и 2,4,6-трихлорфенолы (**2,4,5-ТХФ** и **2,4,6-ТХФ**) относятся к экологически стойкому классу загрязнителей, известных как полихлорированные фенолы [1]. В то время как монохлорфенолы и дихлорфенолы естественным образом могут производиться некоторыми бактериями, грибами и насекомыми, природные источники полихлорфенолов не известны [2].

2,4,5-ТХФ и 2,4,6-ТХФ широко используются в качестве клея и консервантов, особенно для пиломатериалов и кожи, а их производные – в качестве гербицидов и фунгицидов [33]. Соответственно, при биодеградации таких соединений бактериями трихлорфенолы часто являются метаболическими интермедиатами. Так, 2,4,5-ТХФ – это первый промежуточный продукт деградации 2,4,5-трихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4,5-Т) в результате проявления активности 2,4,5-Т-оксигеназы (TftAB) (рис. 5а) у штамма *Burkholderia phenoliruptrix* (ранее *Pseudomonas cepacia*, *Burkholderia cepacia*) АС1100. На последующих стадиях 2,4,5-ТХФ-4-монооксигеназа (TftD) (КФ 1.14.13.-) катализирует две реакции окислительного дехлорирования, где 2,4,5-ТХФ сначала трансформируется в 2,5-дихлорбензохинон (2,5-ДХБХ), который химически восстанавливался с помощью либо НАДН либо ФАДН₂ в 2,5-дихлоргидрохинон (2,5-ДХГХ), а затем последний превращается в 2-гидрокси-5-хлор-*n*-бензохинон, который аналогичным образом восстанавливался до 5-ХГГХ (рис. 3а) [34, 35].

Как видно из рис. 5а, монооксигеназа TftD осуществляет две последовательные стадии гидроксирования, как и описанная выше монооксигеназа NpdA2 штамма *Arthrobacter* sp. JS443, и принадлежит к тому же ТС-FDM-семейству. Генерируемый вторым компонентом НАДН, а именно: ФАД-оксидоредуктазой (TftC), флавин

(ФАДН₂) свободно диффундирует к TftD и используется последней скорее в качестве субстрата, а не кофактора, что характерно для всех двухкомпонентных флавинмонооксигеназ. TftD также может окислять 2,4,6-ТХФ до 2,6-дихлорбензохинона (2,6-ДХБХ), но не может далее преобразовывать ни его, ни его восстановленную форму – 2,6-дихлоргидрохинон (2,6-ДХГХ) (рис. 5б) [33].

TftD и TftC показывают сходство последовательностей (идентичности 28 и 40% соответственно) с 4-гидроксифенилацетат-3-монооксигеназой (HpaB) штамма *Thermus thermophilus* HB8 (2YYL) и корринредуктазой (CobR) штамма *Brucella melitensis* (3CB0), другими флавинзависимыми монооксигеназами и флавинредуктазами ТС-FDM-семейства, участвующими в конверсии фенольных соединений [33, 36].

Дальнейший метаболизм промежуточного соединения 5-ХГГХ у штамма АС1100 контролирует кластер генов *fftEFGH*. TftG (КФ 4.5.1.-) дехлорирует 5-ХГГХ с образованием 2-гидрокси-*n*-бензохинона, который затем восстанавливается редуктазой (КФ 1.6.5.7) до ГГХ. TftH расщепляет ароматическое кольцо последнего с образованием МА, а TftE восстанавливает МА до β-кетoadипата [4].

2,4,5-Т-индуцибельная 2-гидрокси-*n*-бензохинонредуктаза, по-видимому, отличается специфичностью субстрата от других хиноновых редуктаз. Продукт гена *fftG*, также представляет собой новый фермент дегидрохлориназу и принадлежит к YCII-суперсемейству, группе мало исследованных белков. Поиск по базам данных выявил несколько белков с неизвестной функцией со сходной структурой, но с относительно низкой идентичностью последовательностей с TftG [37].

Конверсия второго хлорфенола – 2,4,6-ТХФ – подробно изучена для двух штаммов: *Ralstonia pickettii* ДТР0602 [7, 38] и *Cupriavidus necator* JMP134 (ранее *Alcaligenes eutrophus*, *Ralstonia eutropha* и *Wauteria eutropha*) [5, 6].

За использование 2,4,6-ТХФ в качестве единственного источника углерода и энергии у *R. pickettii* ДТР0602 ответственны два генетических кластера *hadRXABC* и *hadSYD*, разделённые участком размером 146 т.п.н. и отдельно регулируемые белками HadR и HadS, соответственно. Сначала 2,4,6-ТХФ преобразуется в 2-хлормалеилацетат (2-ХМА) под действием генов *hadRXABC*, а затем в β-кетoadипат с помощью *hadSYD* (рис. 6).

2,6-ДХБХ был определен в качестве первого метаболического интермедиата конверсии 2,4,6-ТХФ. Эта реакция катализируется флавинмонооксигеназой ТС-FDM-семейства HadA – фермент, который обладает двойной активностью, в катализе гидроксирования и групповой элиминации, как хлорзаместителей, так и нитрогрупп с образованием хинонового продукта. HadX представляет собой второй компонент ТС-FDM-семейства –

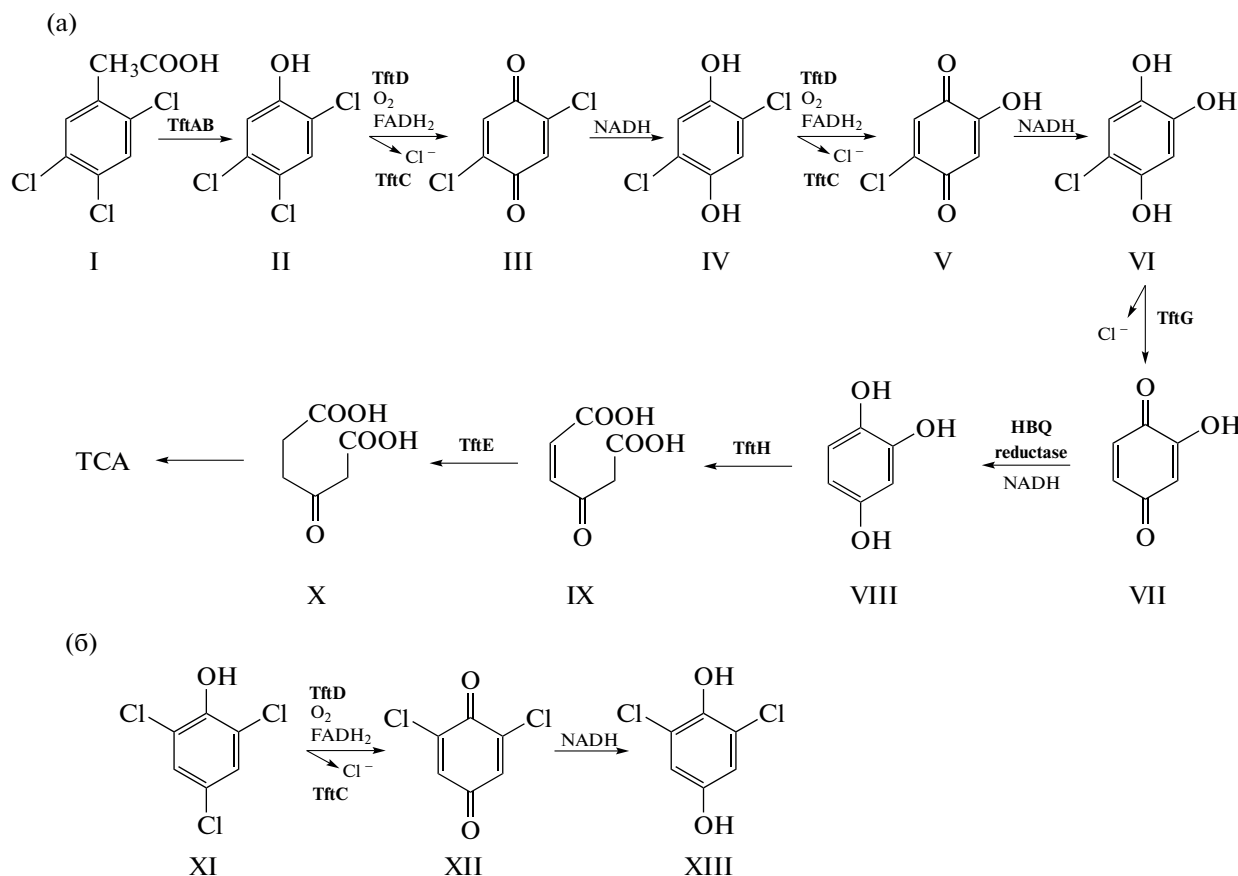


Рис. 5. Пути аэробной деградации 2,4,5-ТХФ (а) и 2,4,6-ТХФ (б) штамма *B. phenoliruptrix* AC1100 [4, 34, 35]. I – 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная кислота; II – 2,4,5-трихлорфенол; III – 2,5-дихлор-*n*-бензохинон, IV – 2,5-дихлоргидрохинон; V – 2-гидрокси-5-хлор-*n*-бензохинон; VI – 5-хлоргидрокси-*n*-бензохинон; VII – 2-гидрокси-*n*-бензохинон; VIII – гидроксигидрохинон, IX – малеиллацетат; X – β-кетoadипат; XI – 2,4,6-трихлорфенол, XII – 2,5-дихлор-*n*-бензохинон, XIII – 2,5-дихлоргидрохинон, TCA – цикл трикарбоновых кислот.

флавинредуктазу, генерирующую ФАДН₂, который передается к NadA посредством свободной диффузии. ФМН-зависимая хинонредуктаза NadB восстанавливает 2,6-ДХБХ в 2,6-ДХГХ. Затем монооксигеназа NadA катализирует второе последовательное гидроксирование 2,6-ДХГХ с образованием 6-ХГГХ, ароматическое кольцо которого расщепляется 6-ХГГХ-1,2-диоксигеназой NadC. В результате еще двух реакций фермент MA-редуктаза генерирует β-кетoadипат [7, 38].

Бактериальный штамм *S. necator* JMP134 может расти на нескольких хлорированных ароматических загрязнителях, включая 2,4-Д и 2,4,6-ТХФ. В то время как катаболизм 2,4-Д является классическим хлоркатехольным путем деградация 2,4,6-ТХФ осуществляется через производные гидрохинона (рис. 6 б), кодируется кластером генов *tcpRXABCYD* [5, 39].

В начале пути 2,4,6-ТХФ-монооксигеназа (TcrA) (КФ 1.14.14.173) заменяет два хлор заместителя на две гидроксильные группы с образованием 6-ХГГХ и с незначительным образованием

2,6-ДХГХ. Для этих реакций второй компонент флавинредуктазы TcrX, чей ген располагается рядом с *tcpA*, используя НАДН в качестве восстановителя, поставляет TcrA восстановленный флавин (ФАДН₂) [6].

2,6-Дихлоргидрокси-*n*-бензохинон (2,6-ДХГХ) для TcrA, также как и для NadA, является логическим промежуточным метаболитическим продуктом, однако некоторые факты свидетельствуют против данного предположения.

Так, TcrA окисляет 2,6-ДХФ до 2,6-ДХГХ, но не далее до 6-ХГГХ. Разница между окислениями TcrA 2,6-ДХФ и 2,4,6-ТХФ состоит в непосредственном продукте. Поскольку монооксигеназы после удаления электроноакцепторной группы (такой как хлор) из фенольных соединений образуют бензохиноны [6], то прямым продуктом окисления 2,4,6-ТХФ TcrA должен быть 2,6-ДХБХ. В то время как гидроксирование четвертого положения 2,6-дихлорфенола происходит посредством простой монооксигеназной реакции с про-

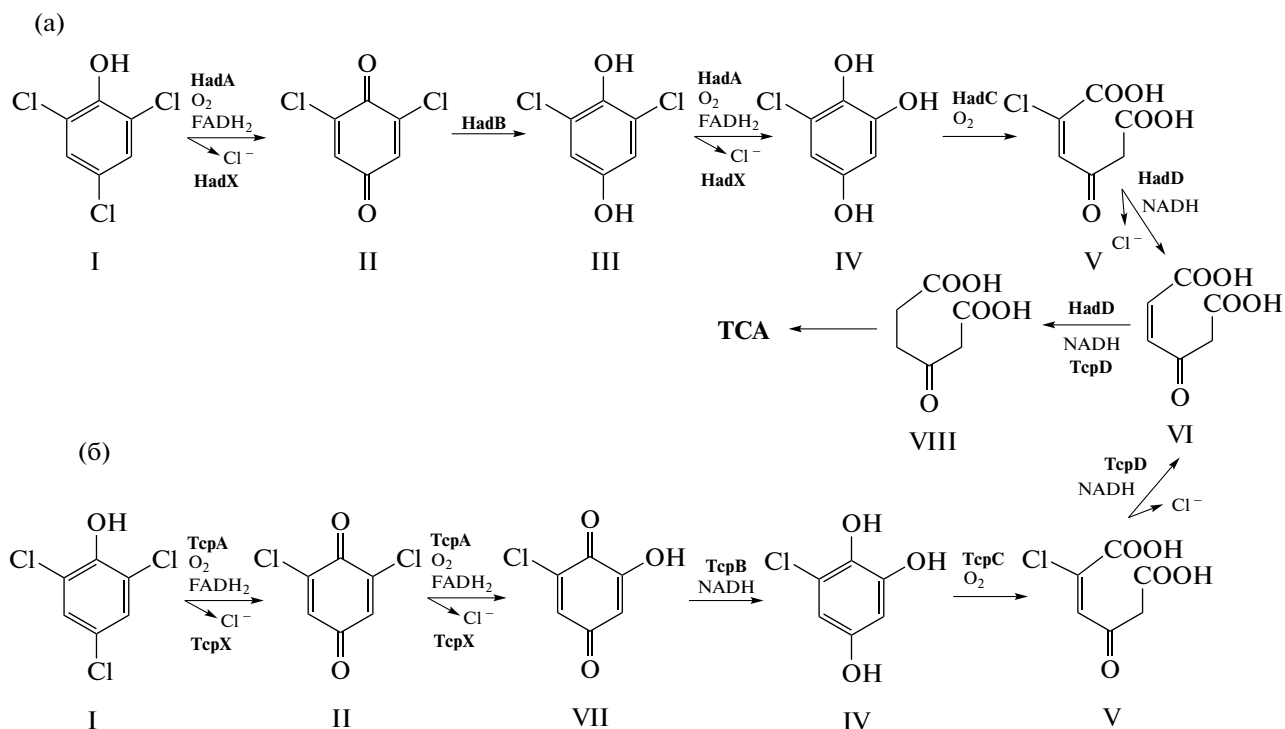


Рис. 6. Пути аэробной деградации 2,4,6-ТХФ штаммов *R. pickettii* DTP0602 (a) [7, 38] и *Cupriavidus necator* JMP134 (б) [5, 6]: I – 2,4,6-трихлорфенол; II – 2,6-дихлор-*n*-бензохинон; III – 2,6-дихлоргидрохинон; IV – 6-хлоргидрокси-2-гидрокси-6-хлор-*n*-бензохинон; V – 2-хлормалеилацетат; VI – малеилацетат, VII – 2-гидрокси-6-хлор-*n*-бензохинон; VIII – β-кетоадипат; TCA – цикл трикарбоновых кислот.

дукцией сразу 2,6-ДХГХ без образования бензохинона в качестве промежуточного соединения.

Кроме того, стехиометрический анализ и эксперименты с ¹⁸O-меткой показали потребление только одной молекулы O₂ на 2,4,6-ТХФ, превращенного в 6-ХГГХ, свидетельствуя в пользу того, что для общей конверсии используется только одна окислительная реакция, а удаление второго хлора происходит с помощью неокислительного процесса. Следовательно, первая реакция является окислительной с образованием 2,6-ДХБХ. Затем фермент использует первый продукт в качестве своего второго субстрата и удаляет второй хлор путем гидролиза с образованием 2-гидрокси-6-хлор-*n*-бензохинона. Последним восстанавливается аскорбатом и НАДН в реакционной смеси до 6-ХГГХ. Образование небольшого количества 2,6-ДХГХ в результате активности TcrA также можно объяснить действием на 2,6-ДХБХ этих восстановителей.

Как и TcrA, рассмотренные выше монооксигеназы HadA и TftD катализируют две последовательные стадии гидроксилирования 2,4,6-ТХФ и 2,4,5-ТХФ, соответственно. Предполагается, что все последовательные гидроксилирования, о которых было известно, осуществляются посредством двух аналогичных окислительных реакций.

Однако, 2,4,6-ТХФ-монооксигеназа (TcrA) штамма JMP134 катализирует гидроксилирование как окислительным, так и гидролитическим способами [6]. Ранее такой каталитический механизм предположили у другой двухкомпонентной флавино-монооксигеназы NpdA2 штамма *Arthrobacter* sp. JS443, фермент также не мог использовать в качестве субстрата восстановленный бензохинон [12].

Способность монооксигеназы TcrA осуществлять реакции двух типов, скорее всего, не связана с наличием второго функционального домена, а обусловлена каталитической разнородностью фермента [6]. Подтверждением данной гипотезы являются эксперименты молекулярного докинга с ФАДН₂ и субстратами (2,4,5-ТХФ, 2,4,6-ТХФ, 2,5-ДХГХ и 2,6-ДХГХ) двух гомологичных монооксигеназ TftD и TcrA. Монооксигеназы показали 65% идентичность их аминокислотных последовательностей и высокое сходство во вторичных структурных элементах, а всего от нескольких ключевых аминокислотных остатков зависят очевидные различия в их каталитической активности и субстратной специфичности. Из-за более гидрофобной природы связывающего кармана TcrA, продукт первой реакции в виде хинона может дольше оставаться в его активном сайте, чем у TftD, что дает достаточно времени, позволяя атаковать молекуле воды. Кроме того, водородная

связь между остатком Arg₁₀₁ и *para*-гидроксильной группой приводит к стабилизации заряда во время атаки молекулы воды на хлор во 2 положении. В конечном итоге это приводит к гидролитическому дехлорированию сразу после оксигеназного дехлорирования без переориентации субстрата или необходимости для него покидать активный сайт. Положение 2,4,6-ТХФ в активном центре TftD также позволяло хлор заместителю в *para*-положении находиться в пределах расстояния водородной связи от His₂₈₉, что делало возможным продуктивное дехлорирование в 4 положении, в то время как для второго дехлорирования 2,6-ДХ-ГХ было необходимо изменение ориентации субстрата [40].

В процессе дальнейшего метаболизма 2,4,6-ТХФ-хинонредуктаза TcrB (КФ 1.14.14.172) штамма JMP134 восстанавливала 6-хлоргидроксибензохинонхинон до 6-ХГГХ, а ароматическое кольцо последнего расщеплялось под действием 6-ХГ-ГХ-1,2-диоксигеназы TcrC (КФ 1.13.11.-). Два других гена *tcpD* и *tcpR* катаболического кластера *tcpRXABCYD* кодировали МА-редуктазу и транскрипционный регулятор LysR-типа, который контролировал экспрессию *tcp*-генов, используя 2,4,6-ТХФ в качестве индуктора [39].

Таким образом, стадии расщепления ароматического кольца в путях деградации 2,4,6-Т у штаммов *R. pickettii* DTP0602 [7] и *S. necator* JMP134 происходят одинаково: 6-ХГГХ трансформируется в 2-хлормалеилацетат. В то время как у штамма *B. phenoliruptrix* AC1100 5-ХГГХ не подвергается расщеплению кольца напрямую. Два дополнительных фермента — дехлориназа и ГГХ-редуктаза, сначала трансформировали 5-ХГ-ГХ в ГГХ. При этом TftH — диоксигеназа штамма *B. phenoliruptrix* AC1100, может использовать только ГГХ, а не 5-ХГГХ или 6-ХГГХ, в качестве субстрата для *ortho*-расщепления его ароматического кольца [35]. Некоторая «избыточность» пути деградации 2,4,5-Т у *B. phenoliruptrix* AC1100 может быть связана с тем, что штамм был получен искусственно, методом так называемого плазмид-ассоциированного молекулярного бридинга [41].

Сравнение выведенных аминокислотных последовательностей катаболических генов *had*, *tcp* и *tft* трех деструкторов трихлорфенолов *R. pickettii* DTP0602, *S. necator* JMP134 и *B. phenoliruptrix* AC1100 показало их значительную гомологию. Причем более высокая гомология наблюдалась для монооксигеназ и гидроксигидрохинон-1,2-диоксигеназ. Так, идентичность аминокислотных последовательностей монооксигеназ NadA с TcrA и TftD составила 87 и 64%, а ГГХ-1,2-диоксигеназ NadC с TcrC и TftH — 73 и 57% соответственно. 6-ХГГХ-редуктазы NadV и TcrB также показали высокую гомологию (идентичность 75%) аминокислотных последовательностей. И наобо-

рот, меньшее сходство продемонстрировали повсеместно распространенные бактериальные ферменты: флавинредуктазы NadX с TcrX и TfdC — 60 и 55% идентичности и МА редуктазы NadD с TcrD и TftE — 66 и 58% соответственно [7].

Таким образом, несмотря на некоторые отличия в путях деградации трихлорфенолов штаммов *R. pickettii* DTP0602, *S. necator* JMP134 и *B. phenoliruptrix* AC1100 наблюдается общая тенденция, заключающаяся в том, что на начальных стадиях двухкомпонентные монооксигеназы катализируют две последовательные реакции замены хлора на гидроксильную группу сначала в *para*-, а затем в *ortho*-положениях по отношению к фенольной ОН-группе. Впоследствии субстратами для диоксигеназ, расщепляющих ароматическое кольцо, служат или гидроксигидрохинон или его хлорированные в 5 или 6 положении производные, то есть метаболизм трихлорфенолов идет по ГГХ-пути.

БАКТЕРИАЛЬНАЯ ДЕГРАДАЦИЯ ПЕНТАХЛОРФЕНОЛА КАК МОДЕЛЬ ВНОВЬ ВОЗНИКШЕГО И ЕЩЕ НЕ ОПТИМИЗИРОВАННОГО ПУТИ КОНВЕРСИИ КСЕНОБИОТИКОВ

Пентахлорфенол (ПХФ) — это синтетическое соединение, которое с 20-х гг. прошлого столетия широко используется в качестве действующего агента пестицидов и антисептиков-консервантов древесины от ее поражения грибком. Так как природных источников ПХФ не существует, следовательно, пути, используемые бактериями для его разложения, возникли примерно за 60 лет с момента начала его применения человеком. За это время, вследствие своей токсичности и стойкости, ПХФ стал одним из приоритетных загрязнителей окружающей среды [42].

Известно, что введение антропогенных химикатов в окружающую среду создает селективное давление, которое может способствовать развитию новых путей, позволяющим бактериям получить доступ к новым источникам углерода, азота или фосфора и/или детоксицировать опасные соединения. Однако разложение антропогенных химических веществ часто оказывается медленным и неполным, поскольку бактерии еще не выработали ферменты, которые эффективно катализируют шаги, необходимые для преобразования таких соединений в метаболиты центрального углеводного обмена [2, 43].

ПХФ из-за присутствия пяти атомов хлора на фенольном кольце более стоек к бактериальной деградации, чем менее хлорированные аналоги [3]. Штамм *Sphingobium* (ранее *Sphingomonas*) *chlorophenolica* ATCC 39723 относится к немногим бактериям, способным полностью минерализовать ПХФ, хотя разложение происходит медлен-

но и деструктор не может расти при высоких концентрациях этого субстрата [2, 43–47].

Деградация ПХФ у *S. chlorophenolicum* ATCC 39723 начинается с гидроксирования субстрата однокомпонентной ПХФ-монооксигеназой (PcpB) (КФ 1.14.13.50) с образованием тетрахлор-*n*-бензохинона (ТХБХ) (рис. 5). Интересно, что фермент способен к удалению из 4 положения широкого ряда заместителей у полигалогенированных фенолов, но при этом необходимо, чтобы во 2 положении присутствовал галоген.

Затем ТХБХ-редуктаза (PcpD) (КФ 1.1.1.404) восстанавливает ТХБХ до тетрахлоргидрохинона (ТХГХ) [45]. Мутантный штамм, лишенный функциональной PcpD, обладал нарушенной способностью разлагать ПХФ, но в то же время удалял из среды 2,3,5,6-тетрахлорфенол с той же скоростью, что и штамм дикого типа, следовательно, PcpD катализирует стадию, необходимую для разложения ПХФ, но не для разложения 2,3,5,6-тетрахлорфенола. Основываясь на известных механизмах действия флавиномоноксигеназ, к которым относится и PcpB, гидроксирование ПХФ приводит к образованию ТХБХ, который PcpD и восстанавливает до ТХГХ. Последний затем превращается в 2,6-ДХГХ посредством двух реакций дегалогенирования, катализируемых дегалогеназой (глутатион-S-трансферазой) PcpC (КФ 1.21.4.5) [48]. Каждая стадия восстановительного дегалогенирования приводит к окислению двух молекул глутатиона до дисульфида глутатиона.

Необходимо отметить, что PcpC подвержен окислительному стрессу, а поврежденный фермент продуцирует глутатионильные конъюгаты (S-глутатионил-трихлоргидрохинон и S-глутатионил-дихлоргидрохинон), которые он не может далее дегалогенировать. Эти конъюгаты могут быть восстановлены и возвращены на путь дегградации действием другой глутатионтрансферазы, PcpF (КФ 1.8.5.7), которая превращает конъюгаты в 2,5,6-трихлор- и 2,6-дихлоргидрохинон, возвращая их на путь дегградации [49].

Fe(II)-зависимая экстрадиольная диоксигеназа (PcpA) (КФ 1.13.11.66) расщепляет 2,6-ДХГХ [50–52] с образованием 2-хлормалеилацетат (2-ХМА). Фермент МА-редуктаза (PcpE) ответственен за восстановление 2-ХМА до МА, а затем до β-кетoadипата.

У штамма ATCC 39723 первоначально были известны пять катаболических генов: *pcpB*, *pcpD*, *pcpC*, *pcpA* и *pcpE*, а также один регуляторный ген *pcpR*, участвующих в дегградации ПХФ. Еще один ген глутатионтрансферазы *pcpF* был описан позже [49]. Гены разбросаны по двум фрагментам: *pcpB*, *pcpD* и *pcpR* организованы как кластер с одинаковой ориентацией, при этом с генов *pcpB* и *pcpD* экспрессируется единый транскрипт. Остальные гены *pcpC*, *pcpA*, *pcpE* и *pcpF* (обозначенный изна-

чально как *orf19*) находятся на другом фрагменте рядом друг с другом, но не внутри оперона. Наличие консервативных сайтов связывания для регуляторного белка PcpR в промоторных областях *pcpB*, *pcpA* и *pcpE* показывает, что гены действуют как единый регулон с PcpR в качестве активатора, однако неизвестно, выступает в качестве коиндуктора сам ПХФ или его последующие продукты. Гены глутатионтрансфераз *pcpC* и *pcpF* экспрессируются конститутивно, вероятно механизм их регуляции с помощью ПХФ бактерия еще не работала [43–45, 49].

Теоретически гены, кодирующие ферменты дегградации ПХФ, могли возникнуть в результате: 1) привлечения предкового фермента без дубликации генов, что требует разделения новых и исходных функций; 2) рекрутированием уже существующего фермента с последующим дублированием и дивергенцией исходного гена с получением для дегградации ПХФ одной специализированной, хотя возможно, и не оптимизированной копии; и 3) горизонтальным переносом генов, кодирующих либо ферменты, которые уже специализированы для расщепления ПХФ, либо ферменты с широкой субстратной специфичностью и часто слабой эффективностью, которые стали полезными, когда бактерия столкнулась с этим субстратом. [43].

Для понимания происхождения ферментов разложения ПХФ сравнили всю последовательность геномов *S. chlorophenolicum* ATCC 39723 и *S. japonicum*, близкородственной сфингомонады, которая разлагает другой хлорорганический пестицид – линдан (γ-гексахлорциклогексан) [53].

Первый фермент пути штамма ATCC 39723 PcpB принадлежит к семейству однокомпонентных флавинозависимых монооксигеназ, к которому также относятся хорошо изученные ферменты фенолгидроксилаза (КФ 1.14.13.7) штамма *Trichosporon cutaneum* [54] и *n*-гидроксибензоатгидроксилаза (КФ 1.14.13.2) представителей рода *Pseudomonas* [55]. Такие ферменты распространены у почвенных бактерий, поскольку фенольные соединения, полученные в результате разложения лигнина, являются важным источником углерода. Отсутствие близкого гомолога у *S. japonicum* позволяет предположить, что гена *pcpB* не было у последнего общего предка *S. chlorophenolicum* и *S. japonicum*. Близкие гомологи *pcpB* также не обнаружены у другой сфингомонады *Sphingomonas wittichii*, поэтому маловероятно, что этот ген произошел от предкового, утерянного у *S. japonicum*. Низкая парная идентичность последовательностей между ПХФ гидроксилазой и другими флавиномоноксигеназами штамма *S. chlorophenolicum* показывает, что *pcpB* не возник в результате недавней дубликации и дивергенции ранее существовавшего гена. Эти данные, наряду с наблюдением, что *pcpB* и *pcpD* находятся в области с относительно низким

ГС-составом, свидетельствуют о том, что ген *pcpB* был приобретен путем горизонтального переноса из неизвестного источника. Эта гипотеза подтверждается наблюдением, что ферменты, показывающие высокую гомологию с PcpB (72–98% идентичность последовательностей), обнаружены у *Novosphingobium lentum* [56], нескольких разлагающих полихлорфенол сфингомонад из Финляндии [57], *Sphingomonas* sp. UG30 [58], а также у некоторых некультивируемых бактерий из проб окружающей среды, собранных с почв, загрязненных ПХФ [59]. Высокая гомология последовательностей этих генов позволяет предположить, что *pcpB* был передан путем горизонтального переноса генов. В то же время, PcpB имеет низкую гомологию (<35% идентичности) с большинством флавиномоноксигеназ бактерий, не разрушающих ПХФ. Высокий уровень дивергенции последовательностей затрудняет идентификацию исходного субстрата PcpB до его вовлечения в путь деградации ПХФ [43].

Второй фермент ТХБХ-редуктаза PcpD не имеет близкого родства с каким-либо другим ферментом в геномах *S. chlorophenolicum* или *S. japonicum*, что позволяет предположить, что она, как и *pcpB*, была приобретена путем горизонтального переноса генов. Хотя существует несколько семейств известных хинонредуктаз, фермент PcpD не входит ни в одну из них. Скорее, ТХБХ-редуктаза наиболее близка белкам, которые служат редуктазными компонентами двухкомпонентных оксигеназ, инициирующих аэробную деградацию ароматических соединений, не имеющих гидроксильных или аминных заместителей [43, 45].

PcpC катализирует стадии восстановительного дегалогенирования, которое также происходит во время деградации линдана у *S. japonicum* [60]. Дегалогеназы PcpC и LinD являются членами семейства глутатион-S-трансфераз (GST) (КФ 2.5.1.18), большинство ферментов которого катализируют нуклеофильную атаку глутатиона на электрофильный субстрат с образованием конъюгата глутатиона. Хотя в геномах штаммов *S. chlorophenolicum* и *S. japonicum* есть многочисленные члены GST-семейства, ТХГХ-дегалогеназа не имеет значительной гомологии любому из них (<25% идентичности парных последовательностей), в том числе LinD, катализирующему восстановительное дегалогенирование 2,5-ДХГХ до 2-хлоргидрохинона в пути деградации линдана [60]. Таким образом, *pcpC*, скорее всего, был приобретен путем горизонтального переноса генов. PcpC и LinD – единственные известные восстановительные дегалогеназы аэробных бактерий, которые действуют на ароматические соединения. Значительное расхождение между этими ферментами предполагает, что они происходят независимо от разных предков – членов GST-семейства. Остатки в активных центрах PcpC и LinD напоминают остатки в ак-

тивных центрах некоторых малеилпируватизомераз, а ТХГХ-дегалогеназа имеет низкую активность с малеилацетоном, аналогом малеилпирувата [61]. Следовательно, ТХГХ-дегалогеназа могла происходить от малеилпируватаизомеразы.

Первые три рассмотренных фермента этого метаболического пути удивительно неэффективны. ПХФ-гидроксилаза (PcpB) имеет очень низкую каталитическую константу (k_{cat} 0.02 с⁻¹) и демонстрирует существенное разобщение – фермент часто не может гидроксилировать субстрат и вместо этого высвобождает H₂O₂ по мере разложения промежуточного продукта С4а-гидроперокси-флавина. ТХБХ-редуктаза (PcpD) показывает низкую скорость оборота (0.7 с⁻¹ при 50 мкМ ТХБХ) [45, 47], а ТХГХ-дегалогеназа (PcpC) подвергается глубокому субстратному ингибированию, ее ароматические субстраты действуют как неконкурентные ингибиторы реакции тиол-дисульфидного обмена, которая необходима для регенерации свободной формы фермента [62]. Эти данные согласуются с гипотезой о том, что ферменты в пути деградации ПХФ еще не эволюционировали до уровня функции, типичной для большинства метаболических энзимов [43]. Поскольку первые детерминанты деградации ПХФ (*pcpB*, *pcpD* и *pcpC*) были обнаружены в двух разных локусах генома штамма ATCC 39723, следовательно, были задействованы как минимум два разных события горизонтального переноса генов.

При исследовании четвертого фермента PcpA оказалось, что его последовательность на 93% идентична другой диоксигеназе LinEb штамма *S. japonicum*, расщепляющей ароматическое кольцо 2,6-ДХГХ. Несмотря на свое название, фермент LinEb не участвует в деградации линдана [63], в котором 2-хлоргидрохинон расщепляет его гомолог LinE. Последовательности диоксигеназ LinE и LinEb имеют 53, а PcpA и LinE – 52% идентичности.

Изучение пятого фермента пути (PcpE) показало, что его последовательность на 91% идентична МА-редуктазе (LinF) штамма *S. japonicum*. Следовательно, последние два гена пути деградации ПХФ, PcpA и PcpE были унаследованы от ближайшего предка *S. chlorophenolicum* и *S. japonicum*.

Таким образом, конверсию ПХФ можно рассматривать, как модель вновь возникшего и еще не оптимизированного пути конверсии ксенобиотиков. Моноксигенирование первичного субстрата осуществляется однокомпонентной гидроксилазой однократно в *n*-положении, в результате чего отщепляется хлор-заместитель и образуется тетрахлор-*p*-бензохинон, который в следующей реакции восстанавливается до тетрахлоргидрохинона. Большинство хлор-заместителей элиминируется из молекулы субстрата до раскрытия ароматического кольца. Субстратом для диокси-

геназы, катализирующей это *мета*-расщепление, является дихлорированный гидрохинон.

Флавінзависимые монооксигеназы, гидроксилирующие субстрат, играют основную роль в гидрохиноновом пути бактериальной деградации хлорфенолов. Монооксигенирование фенолов, содержащих хлор в *пара*-положении, приводит к одновременному гидроксилированию и выделению ионов этого заместителя. При этом атака монооксигеназы на такой субстрат производит сначала хинон, который затем восстанавливается до гидрохинона или гидроксигидрохинона. Соответственно от того какое из этих двух соединений служит субстратом для дальнейшего воздействия диоксигеназ, расщепляющих ароматическое кольцо, различают два альтернативных метаболических пути конверсии этих соединений. Довольно часто наблюдается корреляция пути метаболизма монозамещенных *n*-фенолов с таксономической принадлежностью штамма-деструктора. Преимущественно у грамотрицательных бактерий в результате активности однокомпонентных флавінзависимых монооксигеназ образуется гидрохинон, ароматическое кольцо которого в последствие расщепляется. В то время как у грамположительных бактерий двухкомпонентные флавінзависимые монооксигеназы трансформируют первоначальный субстрат в результате двух последовательных реакций гидроксилирования до гидроксигидрохинона, который служит субстратом для диоксигеназ, расщепляющих ароматическое кольцо.

Однокомпонентные гидроксилазы принадлежат к классу А флавінзависимых монооксигеназ и проявляют узкую субстратную специфичность по отношению к ароматическим соединениям, содержащим активирующую гидроксильную или аминогруппу. Это важное отличие всех флавінсо-держащих оксигеназ от ферментов P_{450} , которые могут гидроксилировать также неактивированные ароматические соединения [11]. Поскольку конечным продуктом катализа однокомпонентных гидроксилаз является гидроксихинон, логично, что эти ферменты выполняют только одно гидроксилирование фенольного субстрата. Однако, скорее всего, это ограничение не является функциональным и второе гидроксилирование вполне возможно для этого класса ферментов. Так, в альтернативном ГХ-пути деградации 4-НФ штаммами *Pseudomonas* sp. 1-7 и *Pseudomonas* sp. WBC-3, однокомпонентные 4-НФ-монооксигеназы PdcA и PnpA скорее всего выполняют второе гидроксилирование субстрата [14, 15].

Однокомпонентная ПХФ монооксигеназа (PcpB) штамма *S. chlorophenolicum* ATCC 39723 катализирует одно гидроксилирование субстрата в 4 положении с образованием ТХБХ. Близкие гомоло-

ги гена этого фермента с 72–98% идентичностью обнаружены у некоторых других – разлагающих ПХФ сфингомонад [57, 58]. С большинством флавінмонооксигеназ бактерий, не способных к конверсии ПХФ, PcpB имеет <35% идентичности последовательностей [43]. Кроме того, при исследовании влияния полихлорфенолов на видовое разнообразие бактерий сообщалось, что добавление ПХФ в почвенную суспензию приводило к избирательному ее обогащению бактериями рода *Sphingomonas* [59]. Таким образом, наблюдается корреляция способности разлагать ПХФ с таксономической принадлежностью бактерии деструктора к сфингомонадам и родственным им видам.

Бактериальная деградация пентахлорфенола может считаться классическим примером нового пути, вновь возникшего и эволюционирующего за 60 лет его активного использования человеком. Бактерии еще не оптимизировали и не отрегулировали ферменты начальных стадий, необходимые для преобразования этого антропогенного соединения в метаболиты центрального углеродного обмена, вследствие чего первые три фермента пути PcpB, PcpD и PcpC штамма *S. chlorophenolicum* функционируют с различными ошибками. Диоксигеназа PcpA катализирует расщепление кольца 2,6-дихлоргидрохинона, то есть метаболизм ПХФ идет по ГХ-пути, что характерно при использовании бактериями однокомпонентных флавінмонооксигеназ.

Двухкомпонентные гидроксилазы принадлежат к классу D флавінзависимых монооксигеназ, ферментом-прототипом для которого является 4-гидроксифенилацетат-3-монооксигеназа (КФ 1.14.13.3), которая была идентифицирована у ряда бактерий. Подобно флавомонооксигеназам класса А, члены класса D обычно активны в отношении ароматических субстратов, таких как 4-гидроксифенилацетат, фенол [64–66], 4-НФ [17] и др. Представители этого класса, по-видимому, ограничены только одним типом оксигенации: (регионселективным) гидроксилированием [11].

Как следует из приведенных выше данных, бактериальные аэробные катаболические пути хлорированных фенолов чаще инициируются двухкомпонентными монооксигеназами, что, возможно, связано с характерной для них широкой субстратной специфичностью. Большинство монооксигеназных компонентов TC-FDM-семейства попадают в одну из двух гомологичных групп [18]. Первая группа – фенол-2-монооксигеназная, состоит из ферментов, которые гидроксилируют фенолы в *орто*-положении к исходной гидроксильной группе и включает 4-гидроксифенилацетатмонооксигеназу HpaB [25], нитрофенолмонооксигеназу NphA1 (КФ 1.14.13.29) [24] и фенолмонооксигеназу PheA [67].

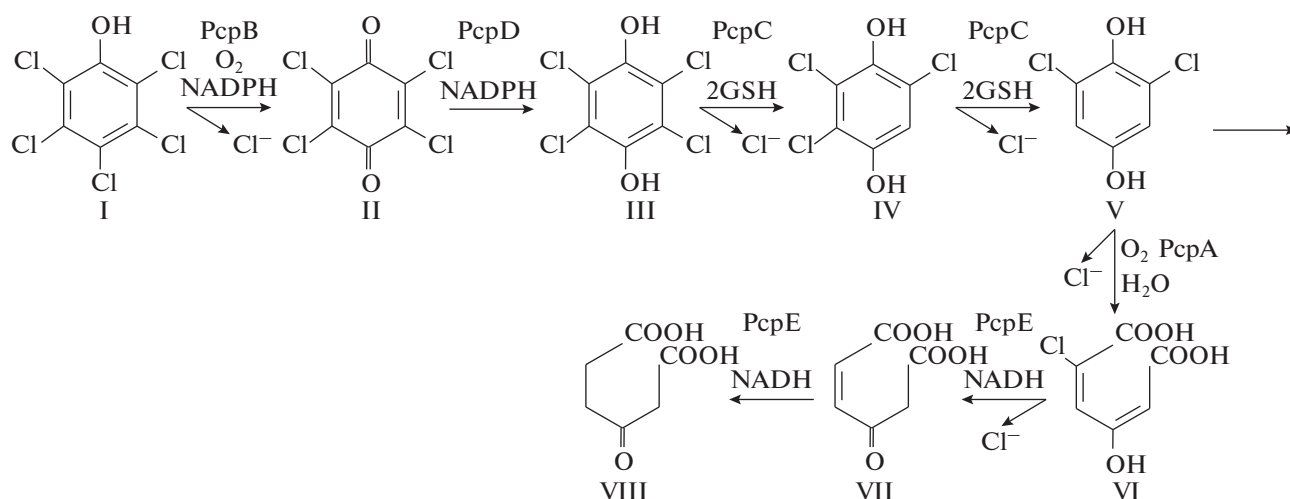


Рис. 7. Путь конверсии ПХФ у штамма *S. chlorophenolicum* ATCC 39723: I – пентахлорфенол; II – тетрахлор-*n*-бензохинон; III – тетрахлоргидрохинон; IV – 2,5,6-трихлоргидрохинон; V – 2,6-дихлоргидрохинон; VI – 2-хлормалеилацетат; VII – maleилацетат; VIII – β-кетoadипат [2].

Вторая – основная гомологичная группа содержит фенол-4-монооксигеназы, которые гидроксилируют фенолы в *para*-положении по отношению к исходной гидроксильной группе. Эта группа включает 4-ХФ-монооксигеназу SphC-I [8], 4-НФ монооксигеназу NpcA [18] и NpdA2 [12], 2,4,5-ТХФ-монооксигеназу TftD [68] и 2,4,6-трихлорфенолмонооксигеназу TcrA [5] и NadA [69]. Природные субстраты всех ферментов в группе фенол-4-монооксигеназ имеют электроноакцепторный заместитель (нитро или хлор) в *para*-положении, который замещается в результате катализируемого монооксигеназой гидроксилирования. Все члены группы фенол-4-монооксигеназы дважды гидроксилируют свои природные субстраты.

При разложении трихлорфенолов сначала всегда происходит гидроксилирование в *para*-, а потом в *ortho*-позиции к первоначальной гидроксильной группе. 2,4,6-ТХФ-монооксигеназа TcrA [6] катализирует последовательное дехлорирование посредством окислительных и гидролитических реакций, при этом субстрат не покидает активного сайта фермента [11, 12]. Второе гидроксилирование субстрата 4-НФ-монооксигеназой NpdA2 [12], по аналогии с TcrA также, скорее всего, осуществляется посредством гидролитической реакции без выхода субстрата из активного центра фермента. Подтверждением этого предположения является то, что как TcrA, так и NpdA2 не могут использовать как субстраты восстановленные бензохиноны – 2,6-ДХГХ и гидрохинон соответственно. Причем второго функционального домена у этих монооксигеназ нет, так что скорее имеет место каталитическая разнородность (неразборчивость) фермента.

Иная каталитическая неразборчивость ферментов была выявлена при конверсии 4-ХК культурами А6 и JS443. Идентификация промежуточного метаболита 5-хлоргидрокси-2-гидрохинона в результате активности монооксигеназ *SphC-I* и *NpdA2*, свидетельствует о слабой позиционной специфичности этих ферментов в отношении субстрата, вследствие чего происходит гидроксилирование его в *para*-позиции по отношению к любой из двух гидроксильных групп [8, 12].

Рассмотренные пути бактериальной деградации хлорированных фенолов показывают, что чем больше хлора содержит молекула ароматического субстрата, чем менее она похожа на природный структурный аналог, тем более проблематично для бактерии выстроить и оптимизировать путь его начальной конверсии. Токсичность хлорированных фенолов кроме количества атомов хлора в молекуле субстрата зависит и от их положения. Известно, что трудность в утилизации субстрата бактериями увеличивается при наличии хлор-заместителя в 3-, 4- и 5-ой позициях [1].

Таким образом, эволюция новых субстратных специфичностей идет через рекрутирование перспективных генов/ферментов посредством дубликаций и мутаций, уже имеющихся в геноме, или путем горизонтального переноса из геномов других бактерий. На первых этапах ферменты, обладающие слабой или даже неспецифичной активностью по отношению к целевым субстратам, показывают низкую эффективность. Затем приходит пора “обкатки” фермента, исправления его ошибок, увеличение специфичности к субстрату, устранение каталитической неразборчивости и оптимизация регуляции.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме № АААА-А18-118022190098-9.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Czaplicka M.* // *Sci. Total Environ.* 2004. V. 322. № 1–3. P. 21–39.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2003.09.015>
2. *Crawford R.L., Jung C.M., Strap J.L.* // *Biodegradation.* 2007. V. 18. № 5. P. 525–539.
<https://doi.org/10.1007/s10532-006-9090-6>
3. *Arora P.K., Bae H.* // *Microb. Cell Fact.* 2014. V. 13. № 1. P. 31.
<https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-31>
4. *Zaborina O., Daubaras D.L., Zago A., Xun L., Saido K., Klem T., Nikolic D., Chakrabarty A.M.* // *J. Bacteriol.* 1998. V. 180. № 17. P. 4667–4675.
<https://doi.org/10.1128/JB.180.17.4667-4675.1998>
5. *Louie T.M., Webster C.M., Xun L.* // *J. Bacteriol.* 2002. V. 184. № 13. P. 3492–3500.
<https://doi.org/10.1128/JB.184.13.3492-3500.2002>
6. *Xun L., Webster C.M.* // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 8. P. 6696–6700.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M312072200>
7. *Hatta T., Fujii E., Takizawa N.* // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2012. V. 76. № 5. P. 892–899.
<https://doi.org/10.1271/bbb.110843>
8. *Nordin K., Unell M., Jansson J.K.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. V. 71. № 11. P. 6538–6544.
<https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6538-6544.2005>
9. *Chenprakhon P., Wongnate T., Chaiyen P.* // *Protein Science.* 2019. V. 28. № 1. P. 8–29.
<https://doi.org/10.1002/pro.3525>
10. *Chenprakhon P., Pimviriyakul P., Tongsook C., Chaiyen P.* // *Enzymes.* 2020. V. 47. P. 283–326.
<https://doi.org/10.1016/bs.enz.2020.05.008>
11. *van Berkel W.J.H., Kamerbeek N.M., Fraaije M.W.* // *J. Biotechnol.* 2006. V. 124. № 4. P. 670–689.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.03.044>
12. *Perry L.L., Zylstra G.J.* // *J. Bacteriol.* 2007. V. 189. № 21. P. 7563–7572.
<https://doi.org/10.1128/JB.01849-06>
13. *Zhang J.J., Liu H., Xiao Y., Zhang X.E., Zhou N.Y.* // *J. Bacteriol.* 2009. V. 191. № 8. P. 2703–2710.
<https://doi.org/10.1128/JB.01566-08>
14. *Zhang S., Sun W., Xu L., Zheng X., Chu X., Tian J., Wu N., Fan Y.* // *BMC Microbiology.* 2012. V. 12. P. 27.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-27>
15. *Wei M., Zhang J.-J., Liu H., Zhou N.-Y.* // *Biodegradation.* 2010. V. 21. № 6. P. 915–921.
<https://doi.org/10.1007/s10532-010-9351-2>
16. *Shen W., Liu W., Zhang J., Tao J., Deng H., Cao H., Cui Z.* // *Bioresour. Technol.* 2010. V. 101. № 19. P. 7516–7522.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.052>
17. *Kadiyala V., Spain J.C.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1998. V. 64. № 7. P. 2479–2484.
<https://doi.org/10.1128/AEM.64.7.2479-2484.1998>
18. *Kitagawa W., Kimura N., Kamagata Y.* // *J. Bacteriol.* 2004. V. 186. № 15. P. 4894–4902.
<https://doi.org/10.1128/JB.186.15.4894-4902.2004>
19. *Takeo M., Murakami M., Niihara S., Yamamoto K., Nishimura M., Kato D., Negoro S.* // *J. Bacteriol.* 2008. V. 190. № 22. P. 7367–7374.
<https://doi.org/10.1128/JB.00742-08>
20. *Liu P.P., Zhang J.J., Zhou N.Y.* // *Int. Biodeter. Biodegr.* 2010. V. 64. № 4. P. 293–299.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.03.001>
21. *Yamamoto K., Nishimura M., Kato D.I., Takeo M., Negoro S.* // *J. Biosci. Bioeng.* 2011. V. 111. № 6. P. 687–694.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.01.016>
22. *Moiseeva O.V., Solyanikova I.P., Kaschabek S.R., Gröning J., Thiel M., Golovleva L.A., Schlömann M.* // *J. Bacteriol.* 2002. V. 184. № 19. P. 5282–5292.
<https://doi.org/10.1128/JB.184.19.5282-5292.2002>
23. *Field J.A., Sierra-Alvarez R.* // *Biodegradation.* 2008. V. 19. № 4. P. 463–480.
<https://doi.org/10.1007/s10532-007-9155-1>
24. *Takeo M., Yasukawa T., Abe Y., Niihara S., Maeda Y., Negoro S.* // *J. Biosci. Bioeng.* 2003. V. 95. P. 139–145.
25. *Galan B., Diaz E., Prieto M.A., Garcia J.L.* // *J. Bacteriol.* 2000. V. 182. № 3. P. 627–636.
<https://doi.org/10.1128/JB.182.3.627-636.2000>
26. *Min J., Zhang J.J., Zhou N.Y.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2014. V. 80. № 19. P. 6212–6222.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02093-14>
27. *Spain J.C., Gibson D.T.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1991. V. 57. № 3. P. 812–819.
<https://doi.org/10.1128/aem.57.3.812-819.1991>
28. *Wei Q., Liu H., Zhang J.J., Wang S.H., Xiao Y., Zhou N.Y.* // *Biodegradation.* 2010. V. 21. № 4. P. 575–584.
<https://doi.org/10.1007/s10532-009-9325-4>
29. *Bae H.S., Lee J.M., Lee S.-T.* // *FEMS Microbiol. Lett.* 1996. V. 145. № 1. P. 125–129.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1996.tb08566.x>
30. *Cho Y.-G., Yoon J.-H., Park Y.-H., Lee S.-T.* // *J. Gen. Appl. Microbiol.* 1998. V. 44. № 5. P. 303–309.
<https://doi.org/10.2323/jgam.44.303>
31. *Ferreira M.I.M., Marchesi J.R., Janssen D.B.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008. V. 78. P. 709–717.
<https://doi.org/10.1007/s00253-008-1343-3>
32. *Chapman P.J., Hopper D.J.* // *Biochem J.* 1968. V. 110. № 3. P. 491–498.
<https://doi.org/10.1042/bj1100491>
33. *Webb B.N., Ballinger J.W., Kim E., Belchik S.M., Lam Ka-Sum, Youn B., Nissen M.S., Xun L., Kang C.* // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 3. P. 2014–2027.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.056135>
34. *Danganan C.E., Ye R.W., Daubaras D.L., Xun L., Chakrabarty A.M.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1994. V. 60. № 11. P. 4100–4106.
<https://doi.org/10.1128/aem.60.11.4100-4106.1994>
35. *Daubaras D.L., Saido K., Chakrabarty A.M.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1996. V. 62. № 11. P. 4276–4279.
<https://doi.org/10.1128/aem.62.11.4276-4279.1996>

36. *Gisi M.R., Xun L.* // J. Bacteriol. 2003. V. 185. № 9. P. 2786–2792.
<https://doi.org/10.1128/JB.185.9.2786-2792.2003>
37. *Hayes R.P., Lewis K.M., Xun L., Kang C.* // J. Biol. Chem. 2013. V. 288. № 40. P. 28447–28456.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.499368>
38. *Pimviriyakul P., Chaiven P.* // J. Biol. Chem. 2018. V. 293. № 48. P. 18525–18539.
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005538>
39. *Sánchez M.A., González B.* // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. № 9. P. 2769–2776.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02584-06>
40. *Hayes R.P., Webb B.N., Subramanian A.K., Nissen M., Popchock A., Xun L., Kang C.* // Int. J. Mol. Sci. 2012. V. 13. № 8. P. 9769–9784.
<https://doi.org/10.3390/ijms13089769>
41. *Kilbane J.J., Chatterjee D.K., Karns J.S., Kellogg S.T., Chakrabarty A.M.* // Appl. Environ. Microbiol. 1982. V. 44. № 1. P. 72–78.
<https://doi.org/10.1128/aem.44.1.72-78.1982>
42. *Lopez-Echartea E., Macek T., Demnerova K., Uhlik O.* // Int. J. Environ. Res. Public Health. 2016. V. 13. № 11. P. 1146.
<https://doi.org/10.3390/ijerph13111146>
43. *Copley S.D., Rokicki J., Turner P., Daligault H., Nolan M., Land M.* // Genome Biol. Evol. 2012. V. 4. № 2. P. 184–198.
<https://doi.org/10.1093/gbe/evr137>
44. *Cai M., Xun L.* // J. Bacteriol. 2002. V. 184. № 17. P. 4672–4680.
<https://doi.org/10.1128/JB.184.17.4672-4680.2002>
45. *Dai M., Rogers J.B., Warner J.R., Copley S.D.* // J. Bacteriol. 2003. V. 185. № 1. P. 302–310.
<https://doi.org/10.1128/JB.185.1.302-310.2003>
46. *Dai M., Copley S.D.* // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. № 4. P. 2391–2397.
<https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.2391-2397.2004>
47. *Hlouchova K., Rudolph J., Pietari J.M., Behlen L.S., Copley S.D.* // Biochemistry. 2012. V. 51. № 18. P. 3848–3860.
<https://doi.org/10.1021/bi300261p>
48. *Xun L., Topp E., Orser C.S.* // J. Bacteriol. 1992. V. 174. № 24. P. 8003–8007.
<https://doi.org/10.1128/jb.174.24.8003-8007.1992>
49. *Huang Y., Xun R., Chen G., Xun L.* // J. Bacteriol. 2008. V. 190. № 23. P. 7595–7600.
<https://doi.org/10.1128/JB.00489-08>
50. *Xun L., Bohuslavek J., Cai M.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999. V. 266. № 2. P. 322–325.
<https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1805>
51. *Xu L., Lawson S.L., Resing K., Babbitt P.C., Copley S.D.* // Biochemistry. 1999. V. 38. № 24. P. 7659–7669.
<https://doi.org/10.1021/bi990103y>
52. *Ohtsubo Y., Miyauchi K., Kanda K., Hatta T., Kiyohara H., Senda T., Nagata Y., Mitsui Y., Takagi M.* // FEBS Lett. 1999. V. 459. № 3. P. 395–398.
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01305-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01305-8)
53. *Nagata Y., Ohtsubo Y., Endo R., Ichikawa N., Ankaï A., Oguchi A., Fukui S., Fujita N., Tsuda M.* // J. Bacteriol. 2010. V. 192. № 21. P. 5852–5853.
<https://doi.org/10.1128/JB.00961-10>
54. *Neujahr H.Y., Gaal A.* // Eur. J. Biochem. 1973. V. 35. № 2. P. 386–400.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1973.tb02851.x>
55. *van Berkel W., Westphal A., Eschrich K., Eppink M., de Kok A.* // Eur. J. Biochem. 1992. V. 210. № 2. P. 411–419.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb17436.x>
56. *Tirola M.A., Mannisto M.K., Puhakka J.A., Kulomaa M.S.* // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68. № 1. P. 173–180.
<https://doi.org/10.1128/AEM.68.1.173-180.2002>
57. *Tirola M.A., Wang H., Paulin L., Kulomaa M.S.* // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68. № 9. P. 4495–4501.
<https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4495-4501.2002>
58. *Cassidy M.B., Lee H., Trevors J.T., Zablotowicz R.B.* // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 1999. V. 23. № 4–5. P. 232–241.
<https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900749>
59. *Beaulieu M., Becaert V., Deschenes L., Villemur R.* // Microb. Ecol. 2000. V. 40. № 4. P. 345–355.
<https://doi.org/10.1007/s002480000055>
60. *Miyauchi K., Suh S.K., Nagata Y., Takagi M.* // J. Bacteriol. 1998. V. 180. № 6. P. 1354–1359.
<https://doi.org/10.1128/JB.180.6.1354-1359.1998>
61. *Anandarajah K., Kiefer P.M., Donohoe B.S., Copley S.D.* // Biochemistry. 2000. V. 39. № 18. P. 5303–5311.
<https://doi.org/10.1021/bi9923813>
62. *Warner J.R., Copley S.D.* // Biochemistry. 2007. V. 46. № 14. P. 4438–4447.
<https://doi.org/10.1021/bi0620104>
63. *Endo R., Kamakura M., Miyauchi K., Fukuda M., Ohtsubo Y., Tsuda M., Nagata Y.* // J. Bacteriol. 2005. V. 187. № 3. P. 847–853.
<https://doi.org/10.1128/JB.187.3.847-853.2005>
64. *Duffner F.M., Kirchner U., Bauer M.P., Müller R.* // Gene. 2000. V. 256. № 1–2. P. 215–221.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00352-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00352-8)
65. *Kirchner U., Westphal A.H., Müller R., van Berkel W.J.* // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. № 48. P. 47545–47553.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M307397200>
66. *van den Heuvel R.H., Westphal A.H., Heck A.J., Walsh M.A., Rovida S., van Berkel W.J., Mattevi A.* // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. № 13. P. 12860–12867.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M313765200>
67. *Duffner F.M., Müller R.* // FEMS Microbiol. Lett. 1998. V. 161. № 1. P. 37–45.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb12926.x>
68. *Hübner A., Danganan C.E., Xun L., Chakrabarty A.M., Hendrickson W.* // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64. № 6. P. 2086–2093.
<https://doi.org/10.1128/AEM.64.6.2086-2093.1998>
69. *Takizawa N., Yokoyama H., Yanagihara K., Hatta T., Kiyohara H.* // J. Ferment. Bioeng. 1995. V. 80. № 4. P. 318–326.
[https://doi.org/10.1016/0922-338X\(95\)94198-Z](https://doi.org/10.1016/0922-338X(95)94198-Z)

Flavin-Dependent Monooxygenases Involved in Bacterial Degradation of Chlorophenols

N. V. Zharikova^{a, *}, V. V. Korobov^a, and E. I. Zhurenko^a

^a Ufa Institute of Biology of Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences RAS, Ufa, 450054 Russia

*e-mail: puzzle111@yandex.ru

There are two central pathways for aerobic bacterial degradation of chlorophenols mainly depends on the degree of halogenation of the substrate. Mono- and dichlorophenols are hydroxylated to (chloro)catechols, were further metabolized by *ortho*-cleavage pathway. Polychlorinated phenols are utilized by bacteria via hydroquinone/hydroxyhydroquinone followed by *meta*-cleavage of its aromatic ring with the formation of maleyl acetate and then β -keto adipate. Most research has focused on organisms and catabolic pathways that involve the degradation of (chloro)aromatic substrates via catechols, while alternative hydroquinone pathway remain poorly understood and described. The review provides information on the metabolic pathways of *p*-chloro-substituted phenols, where special attention is paid to flavin-dependent monooxygenases that catalyze the primary reactions of substrate oxidation.

Keywords: flavin-dependent monooxygenase, biodegradation, 4-chlorophenol, 2,4,5-trichlorophenol, 2,4,6-trichlorophenol, pentachlorophenol, hydroquinone, hydroxyhydroquinone