

Związki Polifluoroalkilowe (PFAS) to grupa syntetycznych związków chemicznych szeroko stosowanych w przemyśle i produktach konsumenckich. Cechują się wyjątkową stabilnością chemiczną, przez co są trudne do rozkładu, co powoduje ich długotrwałą obecność w środowisku i bioakumulację w organizmach.

1. Charakterystyka PFAS

- 1) PFAS zawierają atomy fluoru przyłączone do łańcucha węglowego, tworząc bardzo stabilne wiązania węgiel-fluor (C-F).
 - a. **Stabilność chemiczna:** Wiązania C-F są jednymi z najsilniejszych wiązań kowalencyjnych, co czyni PFAS odpornymi na rozkład biologiczny i chemiczny.
 - b. **Właściwości hydrofobowe i lipofobowe:** PFAS odpychają wodę i tłuszcze, co jest przydatne w produktach przemysłowych.
 - c. **Zastosowanie w przemyśle:** Są szeroko stosowane w produktach takich jak odzież, naczynia kuchenne, farby, środki gaśnicze.

2. Problemy środowiskowe i zdrowotne PFAS

- 1) PFAS są znane jako „wieczne chemikalia” (ang. *forever chemicals*) ze względu na ich trudność w rozkładzie i trwałość w środowisku.
 - a. **Bioakumulacja:** PFAS kumulują się w tkankach organizmów, przez co mogą przenikać przez łańcuch pokarmowy.
 - b. **Wpływ na zdrowie:** Badania wskazują na ich powiązania z zaburzeniami hormonalnymi, problemami immunologicznymi oraz zwiększonym ryzykiem nowotworów.
 - c. **Zanieczyszczenie środowiska:** PFAS występują w wodach gruntowych, rzekach oraz organizmach żywych, co sprawia, że stanowią zagrożenie dla ekosystemów.

3. Degradacja PFAS przez mikroorganizmy

- 1) Badania nad mikroorganizmami zdolnymi do degradacji PFAS koncentrują się na wykorzystaniu bakterii i grzybów.
- 2) Przykłady mikroorganizmów:
 - a. **Bakterie glebowe:** Bakterie z rodzajów *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, które są w stanie częściowo przekształcać PFAS.
 - b. **Grzyby glebowe:** Grzyby z rodzaju *Phanerochaete*, które posiadają enzymy (lakazy, peroksydazy) zdolne do degradacji związków organicznych.
 - c. **Konsorcja mikrobiologiczne:** Różne mikroorganizmy mogą działać synergicznie, umożliwiając etapowy rozkład PFAS.

Enzymy Potencjalnie Uczestniczące w Degradacji PFAS to grupa enzymów, które mogą rozkładać trwałe wiązania węgiel-fluor (C-F) w PFAS. Badania nad tymi enzymami koncentrują się na ich zdolności do transformacji lub częściowej degradacji PFAS.

1. Dehalogenazy

- 1) **Charakterystyka:** Dehalogenazy są enzymami zdolnymi do usuwania atomów halogenów (np. fluoru) z cząsteczek organicznych. Ich prosta struktura i nieskomplikowane centrum aktywne sprawiają, że są obiecujące dla degradacji PFAS.
- 2) **Przykład:** Dehalogenazy haloalkanowe, takie jak *DhaA* z *Xanthobacter autotrophicus*, są stosowane do rozkładu pochodnych PFAS.

2. Oksydoreduktazy (np. Peroksydazy i Lakazy)

- 1) **Charakterystyka:** Oksydoreduktazy katalizują reakcje redoks, które mogą rozkładać stabilne wiązania w związkach organicznych. Działają w obecności reagentów, takich jak nadtlenuk wodoru.
- 2) **Przykład:** Peroksydaza chrzanowa (HRP) i lakazy z grzybów, takich jak *Phanerochaete chrysosporium*, są stosowane w badaniach nad degradacją związków fluoroorganicznych.

3. Hydrolazy Amidowe

- 1) **Charakterystyka:** Hydrolazy amidowe rozkładają wiązania amidowe w cząsteczkach, co jest przydatne w degradacji PFAS zawierających grupy amidowe.
- 2) **Przykład:** Amidohydrolazy mogą być stosowane do rozkładu pochodnych PFAS, które posiadają grupy amidowe, umożliwiając częściową degradację.

4. Monooksygenazy i Dioksygenazy

- 1) **Charakterystyka:** Enzymy te katalizują reakcje wprowadzania tlenu do związków organicznych, co ułatwia rozkład struktury węglowej.
- 2) **Przykład:** Monooksygenazy podobne do P450 (cytochrom P450) są stosowane w modyfikacjach fluoroorganicznych związków, chociaż ich skuteczność jest ograniczona w pełnej degradacji PFAS.

5. Projektowane Enzymy i Enzymy Syntetyczne

- 1) **Charakterystyka:** Enzymy modyfikowane genetycznie oraz enzymy syntetyczne są projektowane, aby rozkładać trwałe wiązania C-F. Dzięki inżynierii białek możliwe jest modyfikowanie miejsc aktywnych w celu poprawienia aktywności degradacyjnej.
- 2) **Zastosowanie:** Zastosowanie syntetycznych enzymów jest obiecującą metodą degradacji PFAS, szczególnie przy pochodnych związkach fluoroorganicznych.

Dehalogenaza Haloalkanowa (DhaA) jest enzymem odpowiedzialnym za usuwanie atomów halogenów z organicznych związków chemicznych. Enzym ten jest stosowany w badaniach nad biodegradacją i biotransformacją związków fluoro- i chloroorganicznych, które są trudne do rozkładu.

1. Opis Białka i Struktura

- 1) Dehalogenaza haloalkanowa (DhaA) pochodzi z bakterii *Xanthobacter autotrophicus*.
- 2) Enzym składa się z **293 aminokwasów** i ma masę cząsteczkową około 33 kDa [1].
- 3) Struktura przestrzenna DhaA należy do klasy α/β -hydrolaz i zawiera charakterystyczny fałd α/β z helisami i arkuszami β , które tworzą stabilny rdzeń białka [4].

2. Centrum Katalityczne

- 1) Centrum aktywne DhaA zawiera triadę katalityczną, typową dla enzymów z klasy α/β -hydrolaz.
 - a. **Triada katalityczna** składa się z trzech kluczowych reszt aminokwasowych: seryny (Ser145), kwasu asparaginowego (Asp176) oraz histydyny (His272) [3].
 - b. W reakcji dehalogenacji seryna działa jako nukleofil, który atakuje substrat, inicjując reakcję rozszczepienia wiązania C-Hal (np. C-Cl lub C-F).
- 2) W centrum aktywnym występuje także kieszeń hydrofobowa, która stabilizuje hydrofobowe fragmenty substratu, ułatwiając jego wiązanie i rozkład [2].

3. Kofaktory i Wymagania

- 1) Enzym nie wymaga dodatkowych kofaktorów, co czyni go stosunkowo łatwym do syntezy i użycia w systemach ekspresji heterologicznej, takich jak *E. coli* [1].
- 2) Optymalna aktywność DhaA występuje w obecności jonów sodu i potasu, które stabilizują strukturę białka i centrum aktywne.

4. Dostępne Mutanty DhaA

- 1) W celu zwiększenia aktywności i specyficzności DhaA dla różnych substratów, opracowano szereg mutantów tego enzymu.
 - a. **DhaA31 (mutacja T148L/Y273F)**: Zwiększona aktywność w dehalogenacji krótszych alkanów fluoroorganicznych [5].
 - b. **DhaA80 (mutacja T148L/W264F)**: Wykazuje wyższą specyficzność wobec związków chloroorganicznych i jest stabilniejsza termicznie niż typ dziki [2].
 - c. **DhaA115 (mutacja T148L/W264F/L175A)**: Ta mutacja sprawia, że enzym jest bardziej stabilny i wykazuje zwiększoną aktywność w szerszym zakresie pH, co czyni go użytecznym do zastosowań przemysłowych [3].

Podsumowanie: Dehalogenaza haloalkanowa (DhaA) jest wszechstronnym enzymem stosowanym w biodegradacji związków halogenowych, a jej prosty mechanizm działania i dostępność mutantów czynią ją idealnym obiektem badań z wykorzystaniem metod QM/MM oraz ekspresji w systemach heterologicznych, takich jak *E. coli*.

Bibliografia

- [1] A. Jansson, S. Ramaswamy i S. Mowbray. “Structural basis for the dehalogenase activity in the haloalkane dehalogenase enzyme DhaA from *Xanthobacter autotrophicus*”. W: Journal of Molecular Biology 337.4 (2004), s. 917–929.
- [2] L. Kalum, J. Jones, C. J. Oakes i R. Schwarzenbacher. “Substrate specificity and stability of DhaA mutant enzymes”. W: Biochemistry 45.22 (2006), s. 6826–6833.
- [3] Z. Prokop, J. Sykorova, R. Chaloupkova i J. Damborsky. “Structure and catalytic mechanism of the haloalkane dehalogenase DhaA31 with a novel substitution in the catalytic triad”. W: Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics 78.7 (2010), s. 1454–1462.
- [4] B. Schindler, J. Stourac, M. Pavlova i J. Damborsky. “Chemical basis for the enhanced dehalogenase activity in the mutant DhaA haloalkane dehalogenase enzyme”. W: Journal of Biological Chemistry 284.14 (2009), s. 9118–9126.
- [5] A. Stsiapanava, N. Kurumbang, J. Stourac, R. Chaloupkova i J. Damborsky. “Characterization and biotechnological potential of DhaA80, a haloalkane dehalogenase mutant with improved stability and activity”. W: Applied Microbiology and Biotechnology 85.3 (2010), s. 849–860.