

**Główny Instytut Górnictwa – Państwowy Instytut Badawczy
w Katowicach**

ROZPRAWA DOKTORSKA

**OPRACOWANIE TECHNOLOGII IMMOBILIZACJI
LAKAZY NA NOŚNIKACH BIOPOLIMEROWYCH
DO USUWANIA BARWNIKÓW ZE ŚCIEKÓW**

mgr Małgorzata Białowąs

Promotor:
dr hab. inż. Stanisław Chałupnik, prof. GIG-PIB

Promotor pomocniczy:
dr inż. Beata Kończak

Katowice, czerwiec 2024

Podziękowania

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania Promotorowi niniejszej rozprawy doktorskiej Panu dr hab. inż. Stanisławowi Chałupnikowi, Prof. GIG-PIB za poświęcony czas i wsparcie podczas realizacji pracy. Udzielone rady i wskazówki przyczyniły się do rozwoju mojej pracy naukowej.

Serdeczne podziękowania kieruję do Promotor pomocniczej mojej rozprawy Pani dr inż. Beaty Kończak za mentoring naukowy, który nie tylko pomógł rozwinąć moją wiedzę i umiejętności, ale także inspirował mnie do podejmowania nowych wyzwań w pracy naukowej. Jednocześnie doceniam życzliwość i poświęcony czas na dzielenie się wiedzą i wymianę doświadczeń sprzyjającą efektywniejszej realizacji pracy.

Dziękuję również moim Najbliższym - Rodzinie i Przyjaciółom za okazaną wyrozumiałość, cierpliwość i wsparcie, co motywowało mnie do dalszego działania i osiągnięcia zamierzonych celów.

Spis treści

1	WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	12
1.1	Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.....	12
1.2	Informacja o procentowym wkładzie w publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej	12
2	WPROWADZENIE	14
3	CEL PRACY I KONCEPCJA BADAŃ	18
3.1	Cel naukowy pracy z uzasadnieniem podjętej tematyki badawczej	18
3.2	Elementy nowości podjętej tematyki badawczej	21
3.3	Cel użyteczny	22
3.4	Problem badawczy	22
3.5	Hipoteza badawcza	23
3.6	Plan badań.....	23
4	PRZEGLĄD LITERATURY DOTYCZĄCY TEMATU ROZPRAWY	24
4.1	Immobilizowana lakaza grzybowa jako "zielony katalizator" w procesie dekoloryzacji (Publikacja 1)	24
4.2	Stabilność operacyjna lakaz w warunkach immobilizacji (Publikacja 2).....	28
4.3	Nośniki do immobilizacji lakazy w procesach dekoloryzacji (Publikacja 3)	30
5	MATERIAŁY I METODY BADAWCZE	33
5.1	Materiały	33
5.2	Metody i procedury badawcze	34
5.3	Zmienne i wskaźniki	40
6	WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA.....	40
6.1	Immobilizacja lakazy na nośnikach biopolimerowych (Publikacja 4).....	40
6.2	Immobilizowana lakaza na nośniku biopolimerowym w dekoloryzacji indygo karminu (Publikacja 5)	49
6.3	Analiza możliwości zastosowania biopolimerów o różnej lepkości jako nośników do immobilizacji lakazy w usuwaniu barwników syntetycznych (Publikacja 6).....	58
7	PERSPEKTYWY DALSZYCH BADAŃ	71
8	PODSUMOWANIE I WNIOSKI	72
9	LITERATURA.....	77
10	SPIS RYSUNKÓW	90
11	SPIS TABEL	92
12	ZAŁĄCZNIKI.....	93

WYKAZ WAŻNIEJSZYCH SKRÓTÓW

ABTS	sól diamonowa kwasu 2,2'-azino-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowego)
AL	kapsułka alginianowa
AL+E	roztwór alginianu sodu zawierający lakazę
AL-Ch	kapsułka alginianowo-chitozanowa
AL-Ch-L	alginianowo-chitozanowa kapsułka enzymatyczna z lakazą
ALe	kapsułka alginianowa z enzymem
ALe_b-HV	kapsułka enzymatyczna na bazie alginianu o wysokiej lepkości, z enzymem (lakaza) rozpuszczonym w buforze
ALe_b-LV	kapsułka enzymatyczna na bazie alginianu o niskiej lepkości, z enzymem (lakaza) rozpuszczonym w buforze
ALe_b-MV	kapsułka enzymatyczna na bazie alginianu o średniej lepkości, z enzymem (lakaza) rozpuszczonym w buforze
ALe_w-HV	kapsułka enzymatyczna na bazie alginianu o wysokiej lepkości, z enzymem (lakaza) rozpuszczonym w wodzie
ALe_w-LV	kapsułka enzymatyczna na bazie alginianu o niskiej lepkości, z enzymem (lakaza) rozpuszczonym w wodzie
ALe_w-MV	kapsułka enzymatyczna na bazie alginianu o średniej lepkości, z enzymem (lakaza) rozpuszczonym w wodzie
ALe-HV	kapsułka na bazie alginianu o wysokiej lepkości
ALe-LV	kapsułka enzymatyczna z lakazą na bazie alginianu o niskiej lepkości
ALe-MV	kapsułka enzymatyczna z lakazą na bazie alginianu o średniej lepkości
AL-HV	kapsułka na bazie alginianu o wysokiej lepkości
AL-L	alginianowa kapsułka enzymatyczna z lakazą
AL-LV	kapsułka na bazie alginianu o niskiej lepkości
AL-MV	kapsułka na bazie alginianu o średniej lepkości
AR	współczynnik kształtu
B	barwnik
BBR	Bismark Brown R
B_{eff}	skuteczność biokatalizy
BZT	biochemiczne zapotrzebowanie tlenu

C	kolistość
Ch	kapsułka chitozanowa
Ch-L	chitozanowa kapsułka enzymatyczna z lakazą
ChZT	chemiczne zapotrzebowanie tlenu
E	enzym lakaza
FL	lakaza w formie wolnej
HBT	1-Hydroksybenzotriazol
IC	indygo karmin
ISA	kwas izatynosulfonowy
IY	wydajność immobilizacji
L	długość
LG	Lanaset Grey G
M	mieszanina barwników indygo karminu i błękitu metylenowego
MB	błękit metylenowy
MOFs	matryce metaloorganiczne
NADH-DCIP	reduktaza NADH-DCIP
RB-5	Reactive Black 5
RBBR	remazolowy błękit brylantowy R
SC	współczynnik sorpcji
S_{eff}	skuteczność sorpcji
T_{eff}	całkowita skuteczność usuwania barwnika
W	szerokość

STRESZCZENIE

W obliczu intensywnego rozwoju działalności przemysłowej, zanieczyszczenie środowiska wodnego staje się coraz poważniejszym problemem. Zanieczyszczenia wprowadzane są do środowiska między innymi w wyniku odprowadzania ścieków nieoczyszczonych lub niedostatecznie oczyszczonych. W tym kontekście szczególną uwagę zwrócono na obecność mikrozanieczyszczeń w środowisku, a wśród nich barwników syntetycznych. Powszechność ich stosowania spowodowała istotny problem środowiskowy, wynikający nie tylko z toksyczności samych barwników, ale także z przemian, jakim związki te mogą podlegać w środowisku. Konwencjonalne metody fizyko-chemiczne usuwania barwników ze ścieków posiadają wady i szereg ograniczeń. Stąd istnieje pilna potrzeba ulepszania istniejących metod oczyszczania oraz opracowywania nowych technologii w gospodarce wodno-ściekowej, a także poszukiwania technologii bazujących w głównej mierze na bioprocessach i biokatalizie, jako kierunku stanowiącego jeden z kluczowych sektorów badań w kierunku innowacji.

Konieczność ochrony środowiska, poprawa świadomości ekologicznej społeczeństwa, jak i wzrost restrykcyjności regulacji prawnych, zwróciły moją uwagę na rozwój zielonych technologii ukierunkowanych na zastosowanie enzymów w procesach technologicznych, w tym w szczególności w technologiach oczyszczania ścieków. Pomimo znacznego potencjału do przemysłowego zastosowania enzymów, wciąż istnieje szereg ograniczeń związanych z ich wykorzystaniem w procesach technologicznych, z uwagi na ich niską stabilność w formie natywnej oraz ich wrażliwość na zmienne warunki środowiska reakcji. Istnieje zatem potrzeba dalszych badań nad immobilizacją enzymów, jako metody ukierunkowanej na zwiększenie ich stabilności często w niekorzystnych warunkach procesowych, jednocześnie umożliwiając odzysk i ponowne użycie biokatalizatora.

Na podstawie przeglądu literatury uznałam, że procesy usuwania zanieczyszczeń, w tym barwników ze ścieków, oparte na biokatalizie stanowią obiecujący kierunek badań w obszarze gospodarki wodno-ściekowej. Wysoki potencjał w tym zakresie wykazuje lakaza - enzym należący do oksydoreduktaz, charakteryzujący się niską specyficznością substratową oraz zdolnością do degradacji szerokiej gamy zanieczyszczeń, w tym barwników. Stąd w ramach niniejszej pracy podjęłam tematykę badawczą w obszarze technologii immobilizacji lakazy na nośnikach biopolimerowych do usuwania barwników. Immobilizację lakazy prowadziłam z wykorzystaniem alginianu sodu i chitozanu - nośników biopolimerowych charakteryzujących się łatwą biodegradowalnością, brakiem toksyczności i biokompatybilnością. W ramach pracy

opracowałam technologię immobilizacji lakazy z wykorzystaniem nośników biopolimerowych, scharakteryzowałam parametry geometryczne kapsulek z immobilizowaną lakazą, jak i kapsulek bez enzymu. Skuteczną immobilizację enzymu potwierdziłam za pomocą spektroskopii Ramana, określiłam wpływ pH na aktywność wolnej i immobilizowanej lakazy, przeprowadziłam także testy wpływu warunków przechowywania na aktywność enzymatyczną opracowanych kapsulek. Istotnym elementem pracy było również wyznaczenie efektywnej dawki immobilizowanego enzymu oraz optymalnej temperatury dla przeprowadzenia procesu dekoloryzacji.

Na podstawie uzyskanych wyników badań stwierdziłam, że istotne jest, aby nośnik biopolimerowy z jednej strony stanowił barierę ochronną dla enzymu, ale jednocześnie z drugiej strony umożliwiał procesy dyfuzji substratu, zapewniając kontakt lakazy z zanieczyszczeniem, które ma podlegać biodegradacji. Istotnym parametrem dla zrównoważenia tych procesów jest usieciowanie nośnika biopolimerowego. Dla odpowiedniego zrównoważenia procesów sorpcji, jak i biokatalizy podczas dekoloryzacji, ale jednocześnie odpowiedniego zabezpieczenia enzymu w niekorzystnych warunkach środowiska reakcji, uznałam, że istotne jest zbadanie kwestii właściwości samego nośnika, w tym w szczególności jego lepkości.

Zgodnie z celem naukowym, którym jest analiza możliwości zastosowania biopolimerów o różnej lepkości jako nośników do immobilizacji lakazy, główne zamierzenia badawcze obejmowały badanie alginianu sodu o różnej lepkości (wysoka, średnia i niska lepkość) jako nośnika do immobilizacji lakazy do zastosowania w procesie dekoloryzacji indygo karminu (barwnik anionowy), błękitu metylenowego (barwnik kationowy) oraz ich mieszaniny.

Przeprowadzone badania pozwoliły na wyznaczenie parametrów lepkości nośnika do immobilizacji. Wyniki testów dekoloryzacji umożliwiły określenie skuteczności procesu, a także identyfikację mechanizmów (sorpcja, biokataliza) dekoloryzacji badanych barwników i ich mieszaniny, w zależności od lepkości użytego alginianu jako nośnika do immobilizacji lakazy. Niezależnie od lepkości alginianu, dekoloryzacja indygo karminu (barwnik anionowy) zachodziła głównie na drodze biokatalizy, z kolei podczas dekoloryzacji błękitu metylenowego (barwnik kationowy) dominował proces sorpcji. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdziłam, że lepkość alginianu wpływa na skuteczność enzymatycznej degradacji błękitu metylenowego, bowiem najwyższą całkowitą skuteczność usuwania tego barwnika uzyskano przy użyciu kapsulek enzymatycznych na bazie alginianu o najwyższej lepkości, gdzie dekoloryzacja nastąpiła na drodze obu mechanizmów - biokatalizy i sorpcji. Zastosowanie kapsulek enzymatycznych na bazie alginianu o niskiej lepkości skutkowało usunięciem błękitu

metylenowego wyłącznie na drodze sorpcji, zatem w dekoloryzacji tego barwnika wyższa lepkość alginianu promuje usunięcie na drodze biokatalizy. Mechanizm usuwania barwników z mieszaniny jest odmienny w stosunku do mechanizmu odbarwiania roztworów pojedynczych barwników. Całkowita skuteczność usuwania indygo karminu z mieszaniny była niższa, a dekoloryzacja nastąpiła głównie na drodze sorpcji, niezależnie od użytego do immobilizacji alginianu. Zastosowanie kapsułek na bazie alginianu o wysokiej lepkości umożliwiło usunięcie tego barwnika z mieszaniny również na drodze biokatalizy, przy jednoczesnej najwyższej całkowitej skuteczności usuwania barwnika w porównaniu do kapsułek na bazie alginianów o średniej i niskiej lepkości. Dekoloryzacja błękitu metylenowego w mieszaninie nastąpiła wyłącznie na drodze sorpcji. W ramach badań dokonałam także oceny toksyczności roztworów barwników i ich mieszaniny, jak i roztworów po procesie dekoloryzacji.

Na podstawie przeprowadzonych badań i uzyskanych wyników potwierdziłam, że możliwa jest dekoloryzacja barwników i ich mieszaniny przy użyciu immobilizowanej lakazy na nośniku biopolimerowym o różnej lepkości, przy czym proces ten zachodzi z różną skutecznością i poprzez różne mechanizmy. Tym samym zweryfikowałam i potwierdziłam postawioną hipotezę badawczą. Odpowiedni dobór nośnika w zależności od usuwanego barwnika ma wpływ na mechanizm dekoloryzacji, a w szczególności na procesy sorpcji i biokatalizy. Opracowana technologia immobilizacji lakazy na nośnikach biopolimerowych do usuwania barwników ze ścieków stanowi istotny element wiedzy w obszarze nowoczesnych metod oczyszczania ścieków. Uzyskane wyniki mają znaczący wpływ na rozwój badań w zakresie immobilizowanych enzymów na nośnikach biopolimerowych, zwracając szczególną uwagę na właściwości biopolimerów stosowanych do immobilizacji. Wyniki pracy umożliwiają także określenie dalszego kierunku badań w celu maksymalizacji efektywności usuwania barwników przy użyciu immobilizowanych enzymów, a w dalszej perspektywie potencjalnego zastosowania jako przyjaznej środowisku metody oczyszczania ścieków barwnych.

SUMMARY

Given the intensive development of industrial activity, pollution of the water environment is becoming an increasingly serious issue. One of the ways the pollutants are introduced into the environment is as a result of the discharge of untreated or insufficiently treated wastewater. In this context, special attention has been given to the presence of micropollutants in the environment, among them synthetic dyes. The widespread use of these has caused a significant environmental problem, resulting not only from the toxicity of the dyes themselves but also from the transformations that these compounds can undergo in the environment. Conventional physical and chemical methods for removing dyes from wastewater have disadvantages and a number of limitations. Therefore, there is an urgent need to improve existing treatment methods and develop new technologies in water and wastewater management, as well as to seek technologies based primarily on bioprocesses and biocatalysis, as a direction that represents one of the key sectors of research toward innovation.

The necessity to protect the environment, the improvement of the public's environmental awareness, as well as the increase in the stringency of legal requirements have drawn my attention to the development of green technologies aimed at the use of enzymes in technological processes, particularly in wastewater treatment technologies. Despite the significant potential for industrial application of enzymes, there are still several limitations associated with their use in technological processes, due to their low stability in native form and their sensitivity to varying reaction environment conditions. Thus, there is a need for further research into the immobilization of enzymes as a method aimed at increasing their stability under often unfavorable process conditions, while allowing recovery and reuse of the biocatalyst.

Based on a literature review, I identified biocatalysis-based processes for the removal of pollutants, including dyes from wastewater, as a promising research direction in the field of water and wastewater management. A high potential in this area is demonstrated by laccase, an enzyme belonging to oxidoreductases, characterized by low substrate specificity and the ability to degrade a wide range of pollutants, including dyes. Hence, within the framework of the current thesis, I have undertaken research in the area of technology for the immobilization of laccase on biopolymer carriers for the removal of dyes from wastewater. I conducted the immobilization of laccase using sodium alginate and chitosan - biopolymer carriers characterized by easy biodegradability, lack of toxicity and biocompatibility. As part of the work, I developed the technology of immobilization of laccase using biopolymer carriers and characterized the geometric parameters of beads with immobilized laccase as well as beads

without the enzyme. I confirmed the effective immobilization of the enzyme using Raman spectroscopy, determined the effect of pH on the activity of free and immobilized laccase, and tested the effect of storage conditions on the enzymatic activity of the developed beads. Determining the effective dose of immobilized enzyme and the optimal temperature for performing the decolorization process was also an important part of the work.

Based on these results, I concluded that while it is important the biopolymer carrier acted as a protective barrier for the enzyme, it is also crucial that it allowed the process of substrate diffusion, ensuring contact between the laccase and the contaminant to be biodegraded. An important parameter for balancing these processes is the cross-linking of the biopolymer carrier. In order to adequately balance the two processes of sorption and biocatalysis under decolorization, while adequately protecting the enzyme under the adverse conditions of the reaction environment, I found it is important to investigate the issue of the properties of the carrier itself, including, in particular, its viscosity.

Following the scientific objective of the work, which has been to analyze the feasibility of using biopolymers with different viscosities as carriers for the immobilization of laccase, the main research objectives included the study of sodium alginate with different viscosities (high, medium and low viscosity) as a carrier for the laccase immobilization for use in the decolorization process of indigo carmine (anionic dye), methylene blue (cationic dye) and their mixture. The performed tests allowed the determination of the viscosity parameters of the immobilization carrier. The results of the decolorization tests enabled the evaluation of the efficiency of the process, as well as the identification of the mechanisms (sorption, biocatalysis) of decolorization of the tested dyes and their mixture, depending on the viscosity of the alginate used as a carrier for the immobilization of laccase. Regardless of the viscosity of the alginate, the decolorization of indigo carmine (anionic dye) occurred mainly by biocatalysis, while during the decolorization of methylene blue (cationic dye), the sorption process dominated. Based on the obtained results, it was determined that the viscosity of alginate affects the efficiency of enzymatic degradation of methylene blue, as the highest total efficiency of removal of this dye was obtained using alginate-based enzyme beads with the highest viscosity, where decolorization occurred by both mechanisms - biocatalysis and sorption. The use of low-viscosity alginate-based enzyme beads resulted in the removal of methylene blue only by sorption, so in the decolorization of this dye, the higher viscosity of alginate promotes removal by biocatalysis. The mechanism of dye removal from the mixture is different from that of decolorization of single dye solutions. The total removal efficiency of indigo carmine from the mixture was lower and decolorization occurred mainly by sorption by the beads, regardless of

the alginate used for immobilization. The use of high-viscosity alginate-based beads also enabled the removal of this dye from the mixture by biocatalysis, with the highest total removal efficiency of the dye compared to medium and low-viscosity alginate-based beads. Decolorization of methylene blue in the mixture occurred solely by sorption. As a part of the study, I also evaluated the toxicity of the dye solutions and their mixture, as well as the solutions after the decolorization process.

Based on the research conducted and the obtained results, I confirmed that it is possible to decolorize dyes and their mixture using immobilized laccase on a biopolymer carrier of varying viscosity, and considering the process occurs through different mechanisms and with varying efficiency. Thus, I verified and confirmed the research hypothesis. The appropriate choice of the carrier depending on the dye that is being removed has an impact on the decolorization mechanism and, specifically the processes of sorption and biocatalysis. The developed technology for the immobilization of laccase on biopolymer carriers, for the removal of dyes from wastewater, represents an important contribution to the development of novel methods of wastewater treatment. The results obtained have a significant impact on the development of research in the field of immobilized enzymes on biopolymer carriers, with particular attention to the properties of the biopolymers used for immobilization. The results of the work also provide an opportunity to determine the further direction of research in order to maximize the efficiency of dye removal using immobilized enzymes and, in the long run, the potential application as an environmentally friendly method of dye-containing wastewater treatment.

1 WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

1.1 Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

1. **Deska, M.** & Kończak B. (2019) Immobilized fungal laccase as "green catalyst" for the decolourization process – State of the art. *Process Biochemistry*, 84, 112-123. DOI:10.1016/j.procbio.2019.05.024 (IF = 4,4; MNiSW = 70 pkt)
2. **Deska, M.** & Kończak, B. (2020) Stabilność operacyjna lakaz w warunkach immobilizacji. *Przemysł Chemiczny*, 99, 472-476. DOI:10.15199/62.2020.3.22 (IF = 0,5; MNiSW = 70 pkt)
3. **Deska, M.** & Kończak, B. (2022) Nośniki do immobilizacji lakazy w procesach dekoloryzacji. *Przemysł Chemiczny*, 101, 135-139. DOI:10.15199/62.2022.2.9 (IF = 0,5; MNiSW = 70 pkt)
4. **Deska, M.** & Kończak, B. (2022) Laccase Immobilization on Biopolymer Carriers – Preliminary Studies. *Journal of Ecological Engineering*, 23, 4, 235-249. DOI:10.12911/22998993/146611 (IF = 1,3; MNiSW = 70 pkt)
5. **Białowąg, M.**, Kończak, B., Chałupnik, S., Kalka, J. & Cempa, M. (2024) Alginate-laccase beads in the decolourization of indigo carmine. *Archives of environmental protection*, 50, 1, 45-55. DOI:10.24425/aep.2024.149431 (IF = 1,5; MNiSW = 100 pkt)
6. **Białowąg, M.**, Kończak, B., Chałupnik, S. & Kalka, J. (2024) Analysis of the feasibility of using biopolymers of different viscosities as immobilisation carriers for laccase in synthetic dye removal. *Archives of environmental protection*, 50, 1, 19-34. DOI:10.24425/aep.2024.149429 (IF = 1,5; MNiSW = 100 pkt)

Publikacje 1 – 4 zostały sfinansowane w ramach środków na badania statutowe finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego przyznane dla Głównego Instytutu Górniczego - Państwowego Instytutu Badawczego. Zrealizowane prace statutowe w charakterze kierownika wymieniono w Załączniku nr 1.

1.2 Informacja o procentowym wkładzie w publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej

1. Publikacja 1: Białowąg (Deska) M. 75%, Kończak B. 25%;
2. Publikacja 2: Białowąg (Deska) M. 80%, Kończak B. 20%;
3. Publikacja 3: Białowąg (Deska) M. 80%, Kończak B. 20%;

4. Publikacja 4: Białowas (Deska) M. 75%, Kończak B. 25%;
5. Publikacja 5: Białowas M. 70%, Kończak B. 10%, Chałupnik S. 10%, Kalka J. 5%, Cempa M. 5%;
6. Publikacja 6: Białowas M. 74%, Kończak B. 10%, Chałupnik S. 8%, Kalka J. 8%.

2 WPROWADZENIE

W obliczu intensywnego rozwoju działalności przemysłowej, zanieczyszczenie środowiska wodnego staje się coraz poważniejszym problemem. Zanieczyszczenia wprowadzane są do środowiska między innymi w wyniku odprowadzania ścieków nieoczyszczonych lub niedostatecznie oczyszczonych. Szczególną uwagę zwrócono na obecność mikrozanieczyszczeń w środowisku, a wśród nich barwników syntetycznych (Tkaczyk i in. 2020). Obecność w środowisku wodnym tych związków już przy bardzo niskich stężeniach rzędu 1 mg/l wywołuje szereg negatywnych skutków (Sharma i in. 2021). Powszechność stosowania barwników spowodowała istotny problem środowiskowy. Ich obecność w ściekach, które następnie odprowadzane są do odbiorników wodnych, powoduje poważne zagrożenia dla środowiska i ma negatywny wpływ nie tylko na zdrowie ludzi, ale także na zdrowie innych organizmów będących częścią ekosystemu (Tripathi i in. 2023). Zagrożenie środowiskowe wynika nie tylko z toksyczności samych barwników, ale także z przemian, jakim związki te mogą podlegać w środowisku. Obecność barwników syntetycznych w znacznym stopniu pogarsza jakość wody zbiorników wodnych, zwiększając biochemiczne i chemiczne zapotrzebowanie tlenu (BZT i ChZT), prowadząc do zaburzeń procesu fotosyntezy, hamując wzrost roślin. Związki te mogą również wchodzić w łańcuch pokarmowy i podlegać bioakumulacji. Barwniki mogą także wykazywać toksyczność, mutagenność i rakotwórczość stwarzając istotne zagrożenie dla organizmów wodnych, jak i dla zdrowia ludzi (Lellis i in. 2019).

Rozwój przemysłu tekstylnego przyczynił się do wykorzystania barwników na szeroką skalę. Ich globalna produkcja wynosi ok. $7 \cdot 10^7$ ton na rok (Kishor i in. 2021, Al-Tohamy i in. 2022), z czego szacuje się, że w procesie technologicznym ok. 10-15% barwników nie jest wiązane i uwalniane jest do środowiska wraz ze ściekami (Benkhaya i in. 2020, Moon i in. 2023). Pierwszy syntetyczny barwnik – moweinę, odkrył William Perkin w 1865 roku, co doprowadziło do rewolucji w przemyśle barwników i zapoczątkowało produkcję syntetycznych barwników organicznych na skalę światową. Na początku XX wieku światowa produkcja barwników zlokalizowana była głównie w Europie. Obecnie największymi producentami są Chiny i Indie, które są jednocześnie głównymi dostawcami tkanin na całym świecie (Tkaczyk i in. 2020). Obecnie stosowane barwniki zostały sklasyfikowane i uporządkowane w rejestrze Colour Index (C.I.), a ich klasyfikacja dokonywana jest najczęściej ze względu na budowę chemiczną lub zastosowanie (Benkhaya i in. 2020, Slama i in. 2021). Aktualnie stosowane konwencjonalne metody usuwania barwników ze ścieków (Katheresan i in. 2018, Rane i Joshi 2021, Al-Tohamy i in. 2022) posiadają szereg wad i ograniczeń, stąd istnieje pilna potrzeba

prowadzenia badań mających na celu nie tylko udoskonalanie obecnie stosowanych metod, ale także opracowanie nowych technologii do oczyszczania ścieków zawierających barwniki (Kishor i in. 2021, Al-Tohamy i in. 2022).

W ostatnich latach, wraz z rosnącą świadomością potrzeby ochrony środowiska oraz zobowiązań wynikających z przepisów prawa, jak i dzięki pogłębianej wiedzy naukowej, szczególną uwagę zwrócono na rozwój zielonych technologii, ukierunkowanych na zastosowanie enzymów w procesach technologicznych, w tym w technologiach oczyszczania ścieków (Kües 2015, Feng 2021, Rane i Joshi 2021, Al-Tohamy i in. 2022). Uwagę badaczy skupiają procesy oparte na biokatalizie. Szczególnym zainteresowaniem cieszy się lakaza (Mate i Alcalde 2017, Agrawal i in. 2018, Brugnari i in. 2021, Puspita i in. 2022). Enzym ten występuje w roślinach wyższych, w większości grzybów, w bakteriach, zidentyfikowano go także u owadów. Potencjał do komercyjnego zastosowania mają głównie lakazy pozyskiwane z grzybów należących do Ascomycota oraz Basidiomycota rozkładających drewno, m.in. z: *Irpex lacteus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* (Baldrian 2006, Madhavi i Lele 2009, Fernández-Fernández i in. 2013, Manvalan i in. 2015). Enzym ten z uwagi na niską specyficzność substratową wykazuje zdolność do degradacji różnych zanieczyszczeń (Brugnari i in. 2021). Jednak enzymy w formie natywnej wykazują szereg ograniczeń do zastosowań przemysłowych. W związku z tym, niezbędne są badania nad immobilizacją enzymów, w tym lakazy, jako metody ukierunkowanej na zwiększenie stabilności enzymów w często niekorzystnych warunkach procesowych (Pereira Gonçalves i in. 2019, Alvarado-Ramírez i in. 2021, Latif i in. 2023, Kyomuhimbo i Brink 2023).

Aktualnie obszarem zainteresowania wielu badaczy jest zastosowanie immobilizowanej lakazy do degradacji różnorodnych zanieczyszczeń (Yavaşer i Karagözler 2021, Chen i in. 2022, Lassouane i in. 2022, Latif i in. 2022, Lzaod i Dutta 2022, Zhou i in. 2023, Wang i Meng 2024), w tym do usuwania barwników ze ścieków (Zhou i in. 2021, Jeyabalan i in. 2023, Naseem i in. 2023, Oktaviani i in. 2024). Prowadzone są badania dotyczące możliwości zastosowania różnych nośników do immobilizacji lakazy (Zdarta i in. 2018a, Zdarta i in. 2018b, Alvarado-Ramírez i in. 2021, Jafri i in. 2021). Uwagę zwracają nośniki biopolimerowe, w szczególności alginian i chitozan ze względu na ich nietoksyczność oraz biokompatybilność (Yadav i Karthikeyan 2019, Abka-Khajouei i in. 2022, Hurtado i in. 2022, Intisar i in. 2023, Zhang i in. 2023). Wyzwanie wciąż stanowi poprawa funkcjonalności klasycznych nośników, jak i opracowywanie nowych materiałów do immobilizacji enzymów. W tym kontekście właściwości alginianów mogą być istotne dla opracowania technologii immobilizacji lakazy na nośnikach biopolimerowych do usuwania barwników ze ścieków.

Alginian sodu jest liniowym polisacharydem zbudowanym z reszt kwasu α -L-guluronowego i β -D-mannuronowego połączonych wiązaniami glikozydowymi. W cząsteczce alginianu wyróżnia się bloki G, bloki M oraz bloki GM. Masa cząsteczkowa alginianu, jak i ułożenie poszczególnych monomerów w łańcuchu oraz udział procentowy każdego monomeru, są czynnikami, które powodują znaczne różnice strukturalne i nadają im specyficzne właściwości fizykochemiczne. Zawartość, skład i stosunek M/G dla danego alginianu może różnić się nie tylko w zależności od gatunku i wieku alg, z których jest ekstrahowany, od lokalizacji, położenia geograficznego i pory roku, ale także od tkanki w obrębie tego samego gatunku. Ta zmienność przekłada się na właściwości funkcjonalne danego alginianu, w tym lepkość, rozpuszczalność, reakcję z jonami metali i właściwości żelowania (Silva i in. 2012, Ma i in. 2014, Fertah i in. 2017, Rhein-Knudsen i in. 2017, Abka-Khajouei i in. 2022). Właściwości alginianów rozpatrywano w kontekście zastosowania w biomedycynie i przemyśle rolniczym (Łabowska i in. 2019, Martínez-Cano i in. 2022).

Tematyka eksplorująca kwestie właściwości alginianów w kontekście pożądanych cech opracowywanych na ich bazie nośników, wydaje się kluczowa dla opracowania efektywnych preparatów z immobilizowanymi enzymami. Stąd równie interesujące wydaje się być zbadanie tych zagadnień w kontekście wykorzystania biopolimerów, w szczególności alginianu sodu, jako nośnika do immobilizacji lakazy, a dokładnie zbadanie wpływu lepkości biopolimerów na skuteczność usuwania barwników z wykorzystaniem immobilizowanej lakazy w procesach usuwania barwników. W tym celu w ramach niniejszej pracy dekoloryzacji poddano barwniki: indygo karmin (barwnik anionowy), błękit metylenowy (barwnik kationowy), jak i ich mieszaninę. Indygo karmin (IC) to anionowy, niebieski, syntetyczny barwnik, znajdujący szerokie zastosowanie w różnych branżach, w tym farmaceutycznej, tekstylnej, garbarskiej, spożywczej i kosmetycznej (Mohan i in. 2022, Ristea i Zarnescu 2023). Szczególnie w sektorze tekstylnym indygo karmin jest szeroko stosowany w procesie barwienia odzieży dżinsowej (Choi 2021, Wang i in. 2022). Ze względu na jego powszechne wykorzystanie i toksyczny wpływ na ekosystemy wodne, barwnik ten uznawany jest jako zanieczyszczenie, które musi zostać usunięte przed zrzutem do środowiska (Behera i in. 2021). Jako skutki narażenia na ten barwnik u ludzi wskazuje się m.in. podrażnienia skóry, trwałe uszkodzenia rogówki, nudności, biegunkę i wymioty (Ahlawat i in. 2022, Leonties i in. 2022, Mohan i in. 2022). Obok indygo karminu, istnieją także szeroko stosowane komercyjne barwniki kationowe, do których należy m.in. błękit metylenowy (Oladoye i in. 2022, Rendón-Castrillón i in. 2024). Błękit metylenowy to syntetyczny, kationowy barwnik powszechnie stosowany w barwieniu tkanin w przemyśle odzieżowym i tekstylnym, a także w procesach barwienia papieru i skóry, wykorzystywany jest

także w przemyśle farmaceutycznym, drukarskim i dywanowym (Oladoye i in. 2022, Li i in. 2023, Ahmed i in. 2024). Znane są również właściwości terapeutyczne błękitu metylenowego, z zastrzeżeniem ściśle określonych zastosowań (Kofidis i in. 2001). Błękit metylenowy wykazuje działanie toksyczne, rakotwórcze, jest związkiem trudnobiodegradowalnym, stąd może powodować poważne zagrożenie dla ludzi, jak i negatywnie wpływać na środowisko. Powoduje szereg zagrożeń dla zdrowia ludzkiego, m.in. takich jak niewydolność oddechowa, ślepotę, zaburzenia trawienne, nudności, biegunkę, wymioty, żółtaczkę, wstrząs, przyspieszenie akcji serca, podrażnienia skóry i oczu (Moorthy i in. 2021, Khan i in. 2022, Oladoye et al. 2022). Skuteczne oczyszczanie ścieków zawierających błękit metylenowy ma kluczowe znaczenie dla złagodzenia niekorzystnego wpływu na środowisko.

Podsumowując, jednym z największych wyzwań stojących obecnie przed przemysłem jest przejście na bardziej ekologiczne i bardziej przyjazne dla środowiska procesy. Wszystkie innowacje w technologiach oczyszczania ścieków mają na celu m.in. zminimalizowanie lub całkowite wyeliminowanie powstawania zanieczyszczeń wtórnych i minimalizację wykorzystania toksycznych i niebezpiecznych surowców, a także przejście na bardziej ekologiczne i zrównoważone metody usuwania zanieczyszczeń ze ścieków, w tym barwników. Złożoność i aktualność problematyki usuwania barwników syntetycznych ze środowiska wodnego wymusza pilną potrzebę ulepszania istniejących metod oczyszczania oraz opracowywania nowych metod w gospodarce wodno-ściekowej, a także poszukiwania technologii bazujących w głównej mierze na bioprocessach i biokatalizie, jako kierunku stanowiącego jeden z kluczowych sektorów badań w kierunku innowacji, znacznie przyczyniając się do rozwoju przemysłu wysokich technologii. Przeprowadzone badania w ramach niniejszej pracy stanowią odpowiedź na nakreślone wyżej wyzwania, wnosząc nową wiedzę w **rozwój metod usuwania barwników przy użyciu immobilizowanych enzymów na nośnikach biopolimerowych, jako przyjaznej środowisku metody oczyszczania ścieków barwnych, ze zwróceniem szczególnej uwagi na właściwości stosowanych do immobilizacji biopolimerów.**

3 CEL PRACY I KONCEPCJA BADAŃ

3.1 Cel naukowy pracy z uzasadnieniem podjętej tematyki badawczej

Celem naukowym pracy jest analiza możliwości zastosowania biopolimerów o różnej lepkości jako nośników do immobilizacji lakazy.

Podjęta tematyka badawcza niniejszej pracy wpisuje się w obszar inżynierii środowiska, w szczególności skupiając się na technologii usuwania barwników ze ścieków. W ramach pracy podniosłam bardzo aktualny i istotny problem związany z obecnością w środowisku wodnym zanieczyszczeń w postaci barwników syntetycznych (Lellis i in. 2019). Jednym z największych wyzwań, przed którymi staje współcześnie przemysł, jest dążenie do procesów bardziej ekologicznych i przyjaznych środowisku. Zatem poszukiwane są wszelkie innowacje w procesach technologicznych, nakierowane na minimalizację, czy całkowitą eliminację zanieczyszczeń, jak i rezygnację z użycia toksycznych i niebezpiecznych surowców i odczynników (Castillo-Suárez i in. 2023). Ponadto widoczna jest pilna potrzeba w zakresie zrównoważonych praktyk zarządzania wodą, w tym ponownego wykorzystania wody i przyjęcia zasad gospodarki o obiegu zamkniętym (Al-Tohamy i in. 2022).

Proponowana nowelizacja dyrektywy o oczyszczaniu ścieków komunalnych zakłada rozszerzenie zakresu dyrektywy na wszystkie aglomeracje o równoważnej liczbie mieszkańców wynoszącej co najmniej 1000 w zakresie obowiązku stosowania oczyszczania wtórnego ścieków komunalnych odprowadzanych do środowiska, ponadto zmiany dotyczyć mają również progów oczyszczania trzeciego stopnia (tj. usuwania azotu i fosforu) **oraz oczyszczania czwartego stopnia (tj. usuwania szerokiego spektrum mikrozanieczyszczeń)**, a także terminów dostosowania się do nowych wymogów (<https://www.consilium.europa.eu/pl/press/press-releases/>; dostęp z dn.: 19.04.2024). Ma to szczególne znaczenie w obliczu intensywnego rozwoju przemysłu m.in. tekstylnego, chemicznego, farmaceutycznego i rolniczego, w wyniku czego do środowiska przedostaje się coraz więcej zanieczyszczeń w postaci m.in. pestycydów, hormonów, antybiotyków, a także **barwników. Rosnąca produkcja i powszechne stosowanie barwników powoduje istotny problem środowiskowy**, wynikający z obecności tych zanieczyszczeń w środowisku wodnym i glebowym. Organiczne barwniki syntetyczne uznawane są jako mikrozanieczyszczenia, które obecne są w ekosystemach wodnych w stężeniach rzędu ng/l do µg/l. **Ze względu na właściwości toksyczne oraz ryzyko generowania szeregu zagrożeń środowiskowych, w szczególności ich negatywny wpływ na faunę i florę, ale także na zdrowie ludzi, istnieje pilna potrzeba nie tylko monitorowania ich zawartości, ale także poszukiwania skutecznych metod eliminacji tych związków ze ścieków, zanim zostaną zrzucone do odbiorników wodnych**

(Tkaczyk i in. 2020). Aktualnie stosowane konwencjonalne metody fizyko-chemiczne do usuwania barwników ze ścieków posiadają wady i szereg ograniczeń, m.in. wynikających z wysokich kosztów, ograniczonych możliwości aplikacyjnych, często wymagają użycia wielu odczynników chemicznych, a także prowadzą do generowania dużych ilości wysoce toksycznych osadów i szlamów jako zanieczyszczeń wtórnych, przyczyniając się do zanieczyszczenia środowiska (Katheresan i in. 2018, Al-Tohamy i in. 2022). Wymaga to zmiany podejścia do procesów oczyszczania ścieków barwnych i poszukiwania nowych, przyjaznych środowisku metod. Na podstawie przeglądu literatury **procesy usuwania zanieczyszczeń, w tym barwników ze ścieków, oparte na biokatalizie uważam jako obiecujący kierunek badań w obszarze gospodarki wodno-ściekowej, stąd w ramach niniejszej pracy podjęłam tematykę badawczą w obszarze technologii immobilizacji lakazy na nośnikach biopolimerowych do usuwania barwników ze ścieków.**

W literaturze światowej widoczny jest wyraźny trend, który wskazuje na znaczący wzrost zainteresowania wykorzystaniem biokatalizatorów w wielu dziedzinach nauki i technologii (Bilal i in. 2019, Deska i Kończak, 2019). W ostatnich latach podejmowano próby immobilizacji enzymów, w szczególności lakazy, do zastosowań w procesach oczyszczania ścieków zawierających barwniki (Puspita i in. 2022, Kyomuhimbo i Brik 2023, Naseem i in. 2023). Jednak wciąż proces ten nie został wystarczająco poznany, co uniemożliwia jego szerokie zastosowanie w praktyce. W projektowaniu immobilizowanych biokatalizatorów do zastosowania w procesie technologicznym, kluczowym jest nie tylko dobór odpowiedniego biokatalizatora oraz metody immobilizacji, ale także nośnika do immobilizacji (Zdarta i in. 2018b, Alvarado-Ramírez i in. 2021). **W niniejszej pracy jako nośniki do immobilizacji enzymu wytypowałam biopolimery - alginian sodu i chitozan, gdyż charakteryzują się one łatwą biodegradowalnością, brakiem toksyczności i biokompatybilnością. Jako enzym modelowy do badań dekoloryzacji wytypowałam lakazę. Wybór ten został podyktowany niską specyficznością substratową tego enzymu oraz zdolnościami do degradacji szerokiej gamy zanieczyszczeń** (Paraschiv i in. 2022, Dong i in. 2023).

W niniejszej pracy zwróciłam uwagę, że nie tylko rodzaj użytego nośnika ma wpływ na skuteczność usuwania barwników, ale także jego właściwości fizykochemiczne. Tematyka eksplorująca kwestie właściwości alginianów w kontekście pożądanых cech opracowywanych na ich bazie nośników wydaje się kluczowa dla opracowania efektywnych preparatów z immobilizowanymi enzymami (Ma i in. 2014). **Na podstawie przeglądu literatury stwierdziłam, iż właściwości alginianów, w tym w szczególności ich lepkość, mogą być istotne dla opracowania efektywnych preparatów z immobilizowaną lakazą do usuwania**

barwników. Nowością prezentowanych badań na tle dostępnych danych literaturowych jest ocena wpływu właściwości alginianów, w tym w szczególności ich lepkości, w kontekście możliwości zastosowania jako nośników do immobilizacji lakazy w procesie usuwania barwników, na przykładzie błękitu metylenowego, indygo karminu i ich mieszaniny. Biorąc pod uwagę, że ścieki przemysłowe często zawierają mieszaniny barwników, w niniejszej pracy dokonałam oceny skuteczności dekoloryzacji zarówno pojedynczych barwników, jak i ich mieszaniny, przy użyciu lakazy immobilizowanej na alginianie sodu o różnej lepkości. Pozyskana nowa wiedza w tym zakresie przyczyni się do rozwoju technologii immobilizacji enzymów do potencjalnego zastosowania w technologiach oczyszczania ścieków barwnych.

Na podstawie informacji przedstawionych powyżej sformułowałam następujące przesłanki przemawiające za podjęciem tematyki badawczej:

1. Istota problemu środowiskowego wynikającego z obecności barwników w środowisku, z uwagi na ich oporność na degradację, zróżnicowane właściwości fizyczno-chemiczne, toksyczność, mutagenność i kancerogenność oraz zdolność do bioakumulacji.
2. Złożoność i aktualność problematyki usuwania barwników syntetycznych ze środowiska wodnego - pilna potrzeba ulepszania istniejących metod oczyszczania oraz opracowywania nowych metod w gospodarce wodno-ściekowej, potrzeba wprowadzania innowacji w zakresie zrównoważonych praktyk zarządzania wodą, w tym ponownego wykorzystania wody, odzysku wód technologicznych i przejścia w kierunku gospodarki o obiegu zamkniętym.
3. Poszukiwanie ekologicznych i zrównoważonych metod usuwania barwników. Widoczny trend w obszarze białej biotechnologii – poszukiwanie technologii bazujących w głównej mierze na bioprocessach i biokatalizie, jako kierunku stanowiącego jeden z kluczowych sektorów badań w kierunku innowacji, znacznie przyczyniając się do rozwoju przemysłu wysokich technologii.
4. Zwiększenie stabilności operacyjnej biokatalizatorów poprzez immobilizację w kontekście możliwości zastosowania enzymów w procesach technologicznych jako „zielonych katalizatorów”.
5. Luka badawcza w obszarze badań właściwości alginianów, w tym w szczególności lepkości, w kontekście zastosowania jako nośników do immobilizacji lakazy do usuwania barwników.

6. Niedostateczna wiedza w zakresie dekoloryzacji mieszanin barwników przy użyciu immobilizowanych enzymów. Większość publikacji naukowych dotyczy oceny skuteczności dekoloryzacji roztworów pojedynczego barwnika.

3.2 Elementy nowości podjętej tematyki badawczej

Elementy nowości podjętej tematyki badawczej obejmują:

1. Ocenę wpływu lepkości biopolimerów na skuteczność usuwania barwników z wykorzystaniem immobilizowanej lakazy.
2. Ocenę skuteczności dekoloryzacji wraz z przeprowadzeniem oceny toksyczności próbek poprocesowych.
3. Identyfikację mechanizmów usuwania barwników kationowych, anionowych oraz ich mieszaniny na przykładzie indygo karminu i błękitu metylenowego.

W zakresie potencjalnych zastosowań przemysłowych istotnym elementem pracy są wyniki badań dotyczące warunków przechowywania opracowanych preparatów enzymatycznych, wyznaczenie warunków procesowych, a także sama przyjazna środowisku technologia usuwania barwników ze ścieków z wykorzystaniem immobilizowanych enzymów, wpisująca się w trendy badań w obszarze inżynierii środowiska i biotechnologii.

Element kluczowy niniejszej pracy stanowi opracowanie preparatów z immobilizowaną lakazą na alginianie sodu, skutecznych w usuwaniu barwników, jak i ich mieszaniny, wraz z oceną toksyczności próbek poprocesowych. Przeprowadzona ocena możliwości zastosowania alginianów o różnej lepkości do immobilizacji lakazy stanowi źródło nowej wiedzy w obszarze immobilizacji enzymów do potencjalnego zastosowania w technologiach oczyszczania ścieków barwnych.

Elementem wyróżniającym przeprowadzone badania na tle innych jest podjęcie tematyki obejmującej właściwości alginianów, w tym w szczególności ich lepkość, w kontekście możliwości zastosowania jako nośników do immobilizacji lakazy do usuwania barwników. Istotnym elementem wyróżniającym jest także identyfikacja mechanizmów dekoloryzacji barwników na przykładzie indygo karminu i błękitu metylenowego oraz ich mieszaniny. Ponadto zgodnie z najlepszą wiedzą, jak do tej pory niewielka liczba prac naukowych podejmuje kompleksowo tematykę procesu dekoloryzacji mieszaniny barwników wraz z oceną toksyczności roztworów poprocesowych. Dotychczasowe badania koncentrują się głównie na usuwaniu pojedynczych barwników.

Elementem znaczącym jest nowa wiedza w obszarze potencjalnych, nowych metod oczyszczania ścieków barwnych, bazujących na immobilizowanych biokatalizatorach.

Rozprawa doktorska ma znaczący wpływ na rozwój metod usuwania barwników ze ścieków, przy użyciu immobilizowanych enzymów na nośnikach biopolimerowych, zwracając szczególną uwagę na właściwości stosowanych do immobilizacji biopolimerów.

Wyniki pracy umożliwiają określenie dalszego kierunku badań w celu maksymalizacji efektywności usuwania barwników przy użyciu immobilizowanych enzymów, a w dalszej perspektywie potencjalnego zastosowania jako przyjaznej środowisku metody oczyszczania ścieków barwnych.

3.3 Cel użyteczny

Celem użytecznym pracy jest ocena możliwości usuwania barwników ze ścieków poprzez zastosowanie technologii immobilizacji lakazy na nośnikach biopolimerowych.

3.4 Problem badawczy

Problemem badawczym jest określenie skuteczności procesu dekoloryzacji barwników i ich mieszaniny przy użyciu immobilizowanej lakazy na nośniku biopolimerowym o różnej lepkości.

W pracy doktorskiej podjęłam próbę odpowiedzi na następujące pytania badawcze:

1. Czy możliwe jest opracowanie preparatów z immobilizowaną lakazą przy użyciu alginianu sodu jako nośnika?
2. Czy możliwe jest uzyskanie kapsułek enzymatycznych o powtarzalnych parametrach geometrycznych oraz w jaki sposób suszenie wpływa na ich parametry geometryczne?
3. Jak wpływa pH na aktywność wolnych i immobilizowanych lakaz przy użyciu alginianu sodu?
4. Jaka jest optymalna temperatura dla prowadzenia procesu dekoloryzacji przy użyciu opracowanych preparatów enzymatycznych na bazie alginianu sodu?
5. Czy możliwe jest usunięcie barwników błękitu metylenowego i indygo karminu oraz ich mieszaniny przy użyciu immobilizowanej lakazy na alginianie sodu?
6. Jakie mechanizmy dominują w usuwaniu barwników kationowych i anionowych na przykładzie błękitu metylenowego i indygo karminu, jak i ich mieszaniny, przy użyciu kapsułek alginianowych z immobilizowaną lakazą?
7. Czy lepkość badanych alginianów wpływa na proces dekoloryzacji barwników indygo karminu, błękitu metylenowego i ich mieszaniny?
8. Jak zmienia się toksyczność roztworów barwników i ich mieszaniny w zależności od stężenia? Jak zmienia się toksyczność roztworów barwników i ich mieszaniny po procesie dekoloryzacji przy użyciu immobilizowanej lakazy na bazie alginianu sodu?

3.5 Hipoteza badawcza

Hipotezę badawczą sformułowałam w następującym brzmieniu: możliwa jest dekoloryzacja barwników i ich mieszaniny przy użyciu immobilizowanej lakazy na nośniku biopolimerowym.

3.6 Plan badań

Plan badań niniejszej pracy obejmował następujące elementy:

1. Analiza literatury naukowej i technicznej w zakresie 1) możliwości zastosowania enzymów w inżynierii środowiska, w tym w szczególności do usuwania barwników przy użyciu immobilizowanych enzymów, 2) technik immobilizacji oraz stosowanych nośników, w szczególności biopolimerów, do immobilizacji enzymów.
2. Wytypowanie nośników do immobilizacji lakazy.
3. Wytypowanie techniki immobilizacji lakazy.
4. Opracowanie preparatów enzymatycznych na nośniku biopolimerowym.
5. Badania warunków przechowywania preparatów enzymatycznych.
6. Analiza parametrów geometrycznych opracowanych preparatów enzymatycznych wilgotnych oraz po wysuszeniu.
7. Wytypowanie barwników modelowych do procesu dekoloryzacji.
8. Optymalizacja procesu dekoloryzacji - temperatura, dawka enzymu, pH.
9. Badania dekoloryzacji barwników indygo karminu, błękitu metylenowego i ich mieszaniny przy użyciu immobilizowanej lakazy.
10. Ocena możliwości zastosowania biopolimerów o różnej lepkości jako nośników do immobilizacji lakazy w celu usuwania barwników.
11. Identyfikacja głównych mechanizmów dekoloryzacji barwników kationowych, anionowych, jak i ich mieszaniny z uwzględnieniem biokatalizy i sorpcji.
12. Analiza toksyczności roztworów barwników przed i po procesie dekoloryzacji.
13. Analiza wyników i sformułowanie wniosków.

4 PRZEGLĄD LITERATURY DOTYCZĄCY TEMATU ROZPRAWY

Rozprawa doktorska ma formę cyklu artykułów naukowych, w skład którego wchodzi 6 publikacji, w tym 3 publikacje przeglądowe (**Publikacje 1-3**) i 3 doświadczalne (**Publikacje 4-6**).

4.1 Immobilizowana lakaza grzybowa jako "zielony katalizator" w procesie dekoloryzacji (**Publikacja 1**)

Przeprowadzona analiza literatury w zakresie potencjału zastosowania immobilizowanych enzymów, w szczególności lakazy do usuwania barwników została dokonana w **Publikacji 1**. W obecnych czasach szczególną uwagę przywiązuje się do realizacji procesów technologicznych w taki sposób, aby były one nie tylko efektywne, ale także przyjazne dla środowiska. **Bioremediacja, w szczególności oparta na biokatalizie, postrzegana jest jako obiecujący kierunek badań. Uwidacznia się wyraźny trend, który wskazuje na znaczący wzrost zainteresowania wykorzystaniem biokatalizatorów w wielu dziedzinach nauki i technologii** (Chapman i in. 2018). W szczególności enzymy z uwagi na swoje unikatowe właściwości katalityczne i fizykochemiczne mogą być wykorzystywane jako tzw. „zielone katalizatory” w złożonych procesach technologicznych, w obrębie różnych gałęzi przemysłu. Pomimo znacznego potencjału do zastosowania przemysłowego enzymów, wciąż istnieje szereg ograniczeń związanych z ich szerokim, komercyjnym wykorzystaniem. Jedne z najistotniejszych ograniczeń to stosunkowo szybka utrata aktywności, brak stabilności oraz pożądana wydajność tylko w określonych warunkach operacyjnych, a także brak możliwości odzysku katalizatora i ponownego jego użycia. Osiągnięcie celu, którym jest efektywna biokataliza jest trudne, ponieważ większość enzymów w postaci natywnej nie jest przystosowana do działania w ekstremalnych warunkach, jakie często mają miejsce podczas procesu przemysłowego. Zatem stosunkowo niska stabilność wolnych białek enzymatycznych oraz ich wrażliwość na zmienne warunki środowiska reakcji przemawia za opracowaniem nowych metod poprawy ich właściwości.

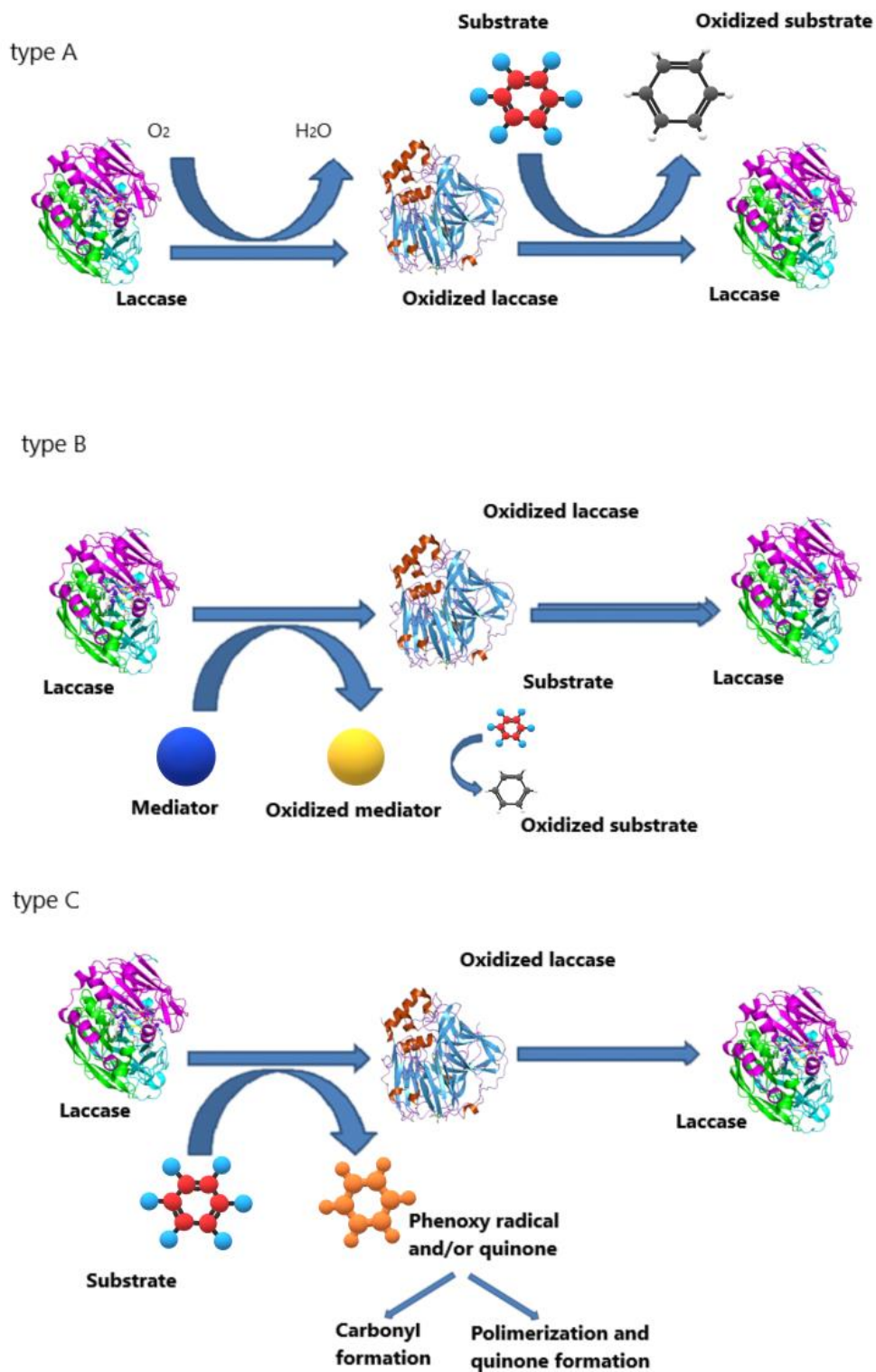
Aktualnie, jednym z głównych nurtów badań dotyczących enzymów jest ich **modyfikacja, poprawa funkcji i optymalizacja ich wydajności na potrzeby ich komercyjnego wykorzystania jako biokatalizatorów**. Podejmowane są próby **poprawy właściwości i stabilności enzymów w kontekście ich przemysłowego wykorzystania, a przedmiot najnowszych badań w tym obszarze stanowi immobilizacja biokatalizatorów na potrzeby procesów biotechnologicznych** (Nair i in. 2013, Sun i in. 2015, Bolibok i in. 2016). Jedną z obiecujących możliwości zastosowania immobilizowanych biokatalizatorów jest ich

wykorzystanie w gospodarce wodno-ściekowej, w szczególności w celu usuwania barwników ze ścieków.

Barwniki to związki o zróżnicowanej strukturze chemicznej. Najpowszechniej używane są w przemyśle włókienniczym, tekstylnym, papierniczym, kosmetycznym, farbiarskim i przemyśle tworzyw sztucznych. Ich toksyczność wynika ze złożonej budowy chemicznej stanowiącej o wysokiej stabilności oraz oporności na rozkład chemiczny, fotolityczny i biologiczny. Wciąż poszukiwane są nowe, bardziej efektywne i przyjazne środowisku metody usuwania barwników, dlatego też rozwój procesów opartych o immobilizowane lakazy jest przedmiotem szczególnego zainteresowania ze względu na ich potencjał do degradacji barwników. W świetle aktualnych doniesień literaturowych technologia unieruchamiania enzymów niesie możliwość korzystnych modyfikacji właściwości katalitycznych i fizykochemicznych enzymów pod kątem zastosowań w procesach ciągłych na skalę przemysłową. Zmodyfikowane właściwości enzymu, poprzez jego unieruchomienie, czynią go bardziej stabilnym i odpornym na warunki środowiska reakcji oraz dają możliwość jego ponownego użycia, prowadzą do wyższej wydajności katalitycznej oraz obniżenia kosztów procesu (Asgher i in. 2017, Bilal i in. 2017). Enzymem najczęściej wykorzystywanym do usuwania barwnych zanieczyszczeń jest lakaza zaliczana do rodziny niebieskich oksydaz wielomiedziowych (ang. MCOs Multicopper Oxidases). Lakaza została po raz pierwszy wyizolowana z japońskiego drzewa lakowego *Rhus vernicifera* (Yoshida 1883, Giardina 2010, Agrawal i in. 2018). Wysoki potencjał w zakresie komercyjnego wykorzystania wykazują głównie lakazy grzybowe pochodzące m.in. z: *Irpex lacteus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* (Baldrian 2006, Madhavi i Lele 2009, Fernández-Fernández 2013, Manavalan i in. 2015). Większość znanych lakaz pochodzenia grzybowego to białka zewnątrzkomórkowe zbudowane z kilku monomerów (50-110 kDa), tworzących w procesie oligomeryzacji multimerowe kompleksy (Claus 2003, Baldrian 2006, Agrawal i in. 2018).

Wyróżnia się trzy typy reakcji katalizowanych przez lakazę (Rysunek 1):

- utlenianie bezpośrednio prostych pochodnych fenolowych bez udziału mediatora (reakcje typu A),
- utlenianie pośrednio substratów fenolowych i niefenolowych w obecności mediatora (reakcje typu B),
- reakcje sprzęgania reaktywnych rodników (reakcje typu C) (Polak i Jarosz-Wilkołazka 2007, Polak i Jarosz-Wilkołazka 2010).



Rysunek 1 Typy reakcji katalizowanych przez lakazę

Źródło: Deska i Kończak 2019 (**Publikacja 1**)

Lakaza ze względu na niską specyficzność substratową stanowi cenne „zielone narzędzie, wykazując szeroką gamę możliwości aplikacyjnych (Agrawal i in. 2018). Zastosowanie immobilizowanej lakazy stanowi obiecujące możliwości w technologiach oczyszczania ścieków z barwnych zanieczyszczeń, co potwierdza wiele doniesień literaturowych (Daâssi i in. 2014, Asgher i in. 2017a, Bagewadi i in. 2017). Możliwości zastosowania lakazy, oprócz biodegradacji barwników, obejmują także ich wykorzystanie w usuwaniu różnorodnych zanieczyszczeń, m.in. związków fenolowych, WWA i związków fosforoorganicznych (Bautista i in. 2010, Rao i in. 2014, Viswanath i in. 2014) oraz farmaceutyków (Yang i in. 2017), a także w bioremediacji gleb zanieczyszczonych w wyniku stosowania środków ochrony roślin, w tym również herbicydów (Mayer i Staples 2002), jak i w procesach technologicznych związanych z przemysłem celulozowo-papierniczym (Singh i in. 2016, Ortner i in. 2018), w procesach bielenia masy pierwotnej, przygotowania i odbarwiania masy makulaturowej oraz produkcji papieru (Asgher i in. 2014, Sharma i in. 2014), w przemyśle spożywczym do stabilizacji i poprawy jakości napojów oraz deoksygenacji produktów zawierających tłuszcze roślinne, które łatwo ulegają zepsuciu (Mayer i Staples 2002). Enzym ten posiada zdolności do usuwania niepożądanych pochodnych fenolowych występujących w zbyt dużych stężeniach w sokach owocowych oraz w winie (Minussi i in. 2002). W **Publikacji 1** dokonano także przeglądu nośników i technik stosowanych do immobilizacji lakazy, a także przywołano najbardziej interesujące wyniki przeprowadzonych badań w zakresie dekoloryzacji barwników przy użyciu immobilizowanej lakazy.

Podsumowując, wyniki przeprowadzonej analizy literatury wskazują, iż w obliczu **istotnego problemu środowiskowego wynikającego z obecności w środowisku barwników syntetycznych**, istnieje potrzeba poszukiwania nowych, bardziej efektywnych i przyjaznych dla środowiska metod ich usuwania. **Badanie procesów z wykorzystaniem immobilizowanych lakaz jest interesujące ze względu na ich potencjał do degradacji różnych rodzajów barwników.** W świetle aktualnych doniesień literaturowych, **technologia immobilizacji enzymów oferuje możliwości korzystnej modyfikacji właściwości katalitycznych i fizykochemicznych enzymów do zastosowań w ciągłych procesach na skalę przemysłową.** Zmodyfikowane właściwości enzymów sprawiają, że są one bardziej stabilne i odporne w warunkach procesowych, a możliwość ich ponownego wykorzystania prowadzi do wyższej wydajności katalitycznej i niższych kosztów procesu (Fernández-Fernández i in. 2013, Asgher i in. 2014, Chapman i in. 2018).

4.2 Stabilność operacyjna lakaz w warunkach immobilizacji (**Publikacja 2**)

W **Publikacji 2** dokonano przeglądu literatury dotyczącej immobilizacji jako obiecującej techniki w zakresie poprawy stabilności operacyjnej lakazy. W obecnych czasach coraz większa uwaga przywiązywana jest do sposobu prowadzenia procesów technologicznych, kierując się nie tylko efektywnością procesu, ale także mając na uwadze aspekty środowiskowe. Przejście od traktowania białek enzymatycznych jako cząsteczek o właściwościach katalitycznych w kierunku ich praktycznego zastosowania w przemyśle jest wyjściem naprzeciw potrzebom współczesnej cywilizacji, bowiem enzymy mogą stanowić niezwykle cenne narzędzie jako „zielone katalizatory” w wielu procesach technologicznych, w obrębie różnych gałęzi przemysłu. Dużym zainteresowaniem w tym obszarze cieszą się immobilizowane lakazy, w szczególności wykorzystywane w procesach dekoloryzacji barwników. Dotychczasowe doniesienia literaturowe wskazujące na **immobilizację jako obiecującą technikę poprawy stabilności operacyjnej enzymów** spowodowały dalszy rozwój badań nad ulepszaniem istniejących lub poszukiwaniem nowych nośników do immobilizacji enzymów.

Immobilizacja enzymu prowadzi do zwiększenia jego stabilności poprzez wielopunktowe oddziaływanie z powierzchnią nośnika, stwarza korzystne mikrośrodowisko, chroniąc białko enzymatyczne przed niekorzystnymi warunkami procesu (Mateo i in. 2007, Liese i Hilterhaus 2013, Rodrigues i in. 2013). Trudno wskazać jedną, uniwersalną technikę immobilizacji. Podczas doboru metody należy rozpatrzyć takie czynniki, jak oddziaływanie enzym-substrat/produkt, enzym-nośnik, substrat/produkt-nośnik, a także odporność matrycy na warunki reakcji (m.in. temperatura, pH). Należy także wziąć pod uwagę rodzaj procesu technologicznego, w którym immobilizowane enzymy będą stosowane (Hanefeld i in. 2009, Liese i Hilterhaus 2013). Istotny element stanowi także dobór odpowiedniego nośnika do immobilizacji. Nośniki można podzielić na: nieorganiczne, organiczne, a także materiały hybrydowe i kompozytowe. Nośnik przede wszystkim musi wykazać zdolność do związania enzymu, równocześnie bez znaczącej utraty jego aktywności enzymatycznej. Najważniejsze parametry, które determinują wybór nośnika to: odporność chemiczna, stabilność w środowisku reakcji, wysokie powinowactwo do enzymu, brak negatywnego wpływu na białko enzymatyczne, obecność reaktywnych grup w strukturze cząsteczki nośnika, dostępność na rynku, stosunkowo niska cena oraz możliwość ponownego wykorzystania. Ponadto przy wyborze matrycy należy wziąć pod uwagę temperaturę, lepkość, polarność, a także charakter kwasowo-zasadowy mieszaniny reakcyjnej, w której pracować będzie immobilizowany enzym (Zdarta i in. 2018a). Jedne z najistotniejszych parametrów

fizykochemicznych procesu obejmują temperaturę i pH. Odczyn środowiska reakcji ma bezpośredni wpływ na aktywność enzymów, gdyż większość białek katalitycznych wykazuje dużą wrażliwość na zmienne warunki pH, najwyższą aktywność enzymatyczną wykazują tylko w bardzo wąskim zakresie pH. Zatem nawet niewielkie zmiany wartości tego parametru mogą powodować istotną utratę aktywności enzymów. Wyniki przeprowadzonej analizy doniesień literaturowych w zakresie potencjału immobilizacji enzymów jako techniki, która umożliwia zabezpieczenie białek przed negatywnym działaniem pH o skrajnych wartościach wydają się być obiecujące (Jaiswal i in. 2016, Zheng i in. 2016, Bagewadi i in. 2017, Olajuyigbe i in. 2019). Również poprawa stabilności termicznej enzymów poprzez ich immobilizację jest istotnym elementem wpływającym na ich możliwości aplikacyjne w procesach technologicznych. Badania prowadzone przy użyciu immobilizowanych lakaz na różnego rodzaju nośnikach wykazały wzrost ich stabilności termicznej w porównaniu do enzymów w formie natywnej. **Wyniki badań opisane w literaturze wskazują, że immobilizacja enzymu stabilizuje jego strukturę, stwarzając przyjazne mikrośrodowisko i chroniąc białko przed denaturacją** (Reyes i in. 1999, Irshad i in. 2012, Nair i in. 2013, Daâssi i in. 2014, Zheng i in. 2016, Saoudi i Ghaouar 2019).

Kolejnym aspektem jest utrzymanie wysokiej aktywności preparatów z immobilizowanymi enzymami. Ma to szczególne znaczenie w kontekście ich praktycznego zastosowania w skali przemysłowej, bowiem nie zawsze preparat z immobilizowanym enzymem może zostać wykorzystany bezpośrednio po jego wytworzeniu. **Stąd też stabilność i trwałość kapsulek enzymatycznych w trakcie magazynowania jest istotnym i bardzo pożądanym parametrem charakteryzującym jego właściwości.** Preparaty immobilizowane posiadają wysoki potencjał do przemysłowych zastosowań również z uwagi na możliwość ich wykorzystywania przez więcej niż jeden cykl katalityczny, przy zachowaniu wysokiej efektywności (Jaiswal i in. 2016). Stanowi to także czynnik warunkujący opłacalność technologii. Obecnie trwają szeroko zakrojone badania nad wydajnością procesową preparatów z immobilizowanymi enzymami do usuwania zanieczyszczeń w kolejnych cyklach operacyjnych, a także warunków ich przechowywania, a uzyskane dotychczas wyniki wydają się obiecujące (Zdarta i in. 2018c).

Podsumowując, przeprowadzona analiza literatury wykazała, że istnieje wyraźny trend nakierowany na badania **możliwości zastosowania enzymów w procesach przemysłowych, co skłania naukowców do badań nad opracowaniem nowych, innowacyjnych preparatów enzymatycznych, charakteryzujących się wysoką stabilnością operacyjną w warunkach procesu technologicznego, a także trwałością podczas przechowywania. Dotychczas**

opracowane techniki immobilizacji enzymów pozwalają na istotną poprawę stabilności operacyjnej preparatów enzymatycznych (wykazują aktywność w szerszym zakresie pH i temperatury), a także umożliwiają ponowne wykorzystanie biokatalizatora, poprzez jego odzysk z mieszaniny poprocesowej. Wciąż trwające badania w kierunku modyfikacji istniejących nośników, a także opracowanie nowych matryc do immobilizacji enzymów o pożądanych cechach funkcjonalnych, ukierunkowane są zarówno na odpowiednią efektywność procesu, w którym opracowane preparaty enzymatyczne mają być zastosowane, jak i uwzględniają kwestie środowiskowe.

4.3 Nośniki do immobilizacji lakazy w procesach dekoloryzacji (**Publikacja 3**)

W **publikacji 3** dokonano przeglądu nośników do immobilizacji lakazy, w szczególności w świetle możliwości aplikacyjnych do usuwania barwnych zanieczyszczeń. Wskazano także możliwości i dalsze wyzwania związane z zastosowaniem unieruchomionych biokatalizatorów w procesach dekoloryzacji. Immobilizacja lakazy prowadzi do zwiększenia jej stabilności i odporności na niekorzystne warunki środowiskowe oraz na działanie enzymów proteolitycznych, a także umożliwia odzysk biokatalizatora w celu ponownego wykorzystania (Fernandez-Fernandez i in. 2013, Bolibok i in. 2016). Obecnie badania skupione są na poszukiwaniu innowacyjnych nośników do immobilizacji lakazy, na modyfikacji i poprawie ich funkcjonalności oraz wydajności w celu ich potencjalnego komercyjnego wykorzystania do usuwania barwnych zanieczyszczeń (Morsy i in. 2020). Przeprowadzone w ostatniej dekadzie badania nad immobilizacją enzymów świadczą o wysokim potencjale tej technologii w kontekście możliwości zastosowania w procesach przemysłowych (Asgher i in. 2014, Jafri i in. 2021, Zhou i in. 2021). W **publikacji 3** scharakteryzowano główne metody immobilizacji enzymów. Wśród nich wyróżnia się metody fizyczne (adsorpcja, pułapkowanie i enkapsulacja) oraz metody chemiczne (poprzez wiązania kowalencyjne oraz sieciowanie). Należy także wspomnieć o nowoczesnych technikach wykorzystywanych podczas immobilizacji, do których należą m.in. elektrospinning i druk 3D. Techniki te przyczyniają się nie tylko do poprawy wydajności procesu, ale także upraszczają poszczególne etapy immobilizacji (Malinowski i in. 2018, Ye i in. 2019, Castrovilli i in. 2020, Liu i in. 2020). Prowadzone są również badania nad projektowaniem nowoczesnych matryc/sieci metaloorganicznych (MOFs) do immobilizacji lakazy (Birhanli i in. 2020). Wybór odpowiedniego nośnika do immobilizacji ma bardzo istotne znaczenie w procesie, gdyż warunkuje aktywność katalityczną biokatalizatora oraz wydajność procesu. **Pożądanym jest, aby nośnik cechował się wysoką wytrzymałością mechaniczną, biozgodnością, możliwością jego regeneracji, a także był odporny na działanie**

drobnoustrojów, jak i aby był dostępny przy relatywnie niskich kosztach. Nośnik służyć ma stabilizacji enzymu, tak więc powinien cechować się jak największą powierzchnią dostępną dla cząsteczek enzymu. Szerokie spektrum wykorzystania danego nośnika jest zatem warunkowane przez takie czynniki, jak: powierzchnia, objętość, porowatość, kształt, forma, stabilność w danych warunkach reakcji, a z punktu widzenia ekonomiki procesu istotna jest także cena nośnika (Mohamad i in. 2015, Wong i in. 2019). Aktualne badania dotyczą zarówno poszukiwania nowych nośników do immobilizacji, jak i modyfikacji dotychczas opracowanych (An i in., 2020, Jafri i in. 2021).

Wśród najczęściej stosowanych, klasycznych nośników do immobilizacji wyróżnia się nośniki nieorganiczne i organiczne. Do nośników nieorganicznych należą m.in.: krzemionka, tlenki metali, hydroksyapatyt, kordieryt, ziemia okrzemkowa, kaolinit, montmorylonit i bentonit. Wśród nośników organicznych można wskazać nośniki syntetyczne (np. żywice jonowymienne, żywice epoksydowe, polistyren, poliuretan, poliamid, poliakrylamid, silikon), a także nośniki naturalne - biopolimery, jak np. alginian, chitozan, celuloza, żelatyna, skrobia i kolagen. **Wśród biopolimerów stosowanych do immobilizacji dużą popularnością cieszy się alginian sodu oraz chitozan. Z uwagi na biodegradowalność, biokompatybilność, nietoksyczność i odpowiednią stabilność fizykochemiczną, postrzegane są jako doskonała alternatywa dla materiałów syntetycznych, aby nakierować procesy na bardziej zrównoważone.** Liczne doniesienia literaturowe wskazują na szerokie możliwości zastosowania alginianu jako nośnika do immobilizacji lakazy w procesach usuwania barwników (Teerapatsakul i in. 2017, Gill i in. 2018, Sondhi i in. 2018, Zdarta i in. 2018b, Rehbein i in. 2019, Shokri i in. 2021). Przykładowo immobilizacja lakazy przy użyciu chitozanu powoduje stabilizację jej struktury, stwarzając przyjazne mikrośrodowisko i chroniąc białko enzymatyczne przed denaturacją (Jaiswal i in. 2016, Zheng i in. 2016). Prace badawcze koncentrują się także na immobilizacji enzymów z wykorzystaniem nanonośników (Zahirinejad i in. 2021). Ponadto w poszukiwaniach materiałów nośnikowych do immobilizacji dużą uwagę skupiają tanie, biodegradowalne i łatwo dostępne materiały odpadowe, które mogą być poddawane modyfikacjom, należą do nich m.in. odpady rolno-przemysłowe, np. pióra kurze (Suman i in. 2019) czy skorupki jaj (Girelli i in. 2021).

Podsumowując, **zastosowanie immobilizowanych enzymów oferuje szereg korzyści** m.in. wzrost wydajności procesu biokatalizy, poprawę stabilności enzymu w zmiennych warunkach procesu (np. pH, temperatura), ograniczenie inhibicji enzymu, wzrost odporności na działanie czynników denaturujących oraz różnego rodzaju zanieczyszczeń, które mogą być obecne w mieszaninie reakcyjnej, wydłużenie czasu aktywności preparatów enzymatycznych,

możliwość zastosowania w procesach ciągłych, możliwość koncentracji pożądaných substancji w bioreaktorze, zwiększoną kontrolę procesu, możliwość oddzielenia biokatalizatora z mieszaniny procesowej i jego ponowne użycie, a także wyższą stabilność podczas przechowywania preparatów immobilizowanych w porównaniu do wolnych enzymów. Jednak obok szeregu ww. zalet, podczas immobilizacji enzymów mogą także wystąpić pewne ograniczenia, jak np. ograniczenie przenikania substratów i produktów (opory dyfuzyjne), ograniczenia, które wynikają bezpośrednio z zastosowanego nośnika, utrata aktywności enzymu w wyniku immobilizacji i straty ilościowe enzymu podczas samego procesu immobilizacji. **Jednak poprzez dobór odpowiedniej metody immobilizacji oraz nośnika do zastosowania w danym procesie technologicznym, większość wyżej wskazanych ograniczeń można znacznie zredukować lub całkowicie usunąć** (Bilal i in. 2017, Alvarado-Ramírez i in. 2021). Wskazuje to na potrzebę badań skoncentrowanych m.in. na uzyskaniu pożądaných właściwości nośników, np. poprzez ich modyfikację, na badaniach eksplorujących ich właściwości (m.in. lepkość), czy też opracowaniu nowych, innowacyjnych nośników, celem poprawy efektywności immobilizacji enzymów, ze szczególnym uwzględnieniem możliwości zastosowania w skali przemysłowej (Teerapatsakul i in. 2017).

5 MATERIAŁY I METODY BADAWCZE

5.1 Materiały

Enzym

Jako enzym modelowy do badań dekoloryzacji wytypowano lakazę pozyskiwaną z grzybów białej zgnilizny drewna *Trametes versicolor*. Wybór ten został podyktowany faktem, że lakaza wykazuje niską specyficzność substratową, co warunkuje możliwość wykorzystania jej w celu rozkładu różnorodnych zanieczyszczeń, w szczególności barwników syntetycznych. W niniejszych badaniach wykorzystano dostępną komercyjnie lakazę (EC 1.10.3.2) z *Trametes versicolor* (numer CAS: 80498-15-3) (Sigma Aldrich, Poznań, Polska).

Nośniki do immobilizacji

W badaniu jako nośniki do immobilizacji enzymu zastosowano biopolimery: alginian sodu (sól sodowa kwasu alginowego) i chitozan (Sigma Aldrich, Poznań, Polska). Wybór ten został podyktowany faktem, iż biopolimery stanowią nietoksyczny, biodegradowalny i biokompatybilny nośnik do immobilizacji enzymów. Testowano alginiany o różnej lepkości. Ich właściwości zestawiono w tabeli poniżej (Tabela 1).

Tabela 1 Właściwości testowanych alginianów sodu

Nazwa	Sól sodowa kwasu alginowego z alg brunatnych (kwas alginowy o niskiej lepkości)	Sól sodowa kwasu alginowego (kwas alginowy o średniej lepkości)	Sól sodowa kwasu alginowego (kwas alginowy o wysokiej lepkości)
Skrót ¹	AL-LV	AL-MV	AL-HV
Numer	A1112	180947	71238
Postać	Proszek		
Numer partii	SLBT1081	MKCG6779	BCCB8704;
Barwa w postaci proszku	Jasnożółty	Jasnobeżowy	Jasnobeżowy
Barwa roztworu	Lekko mętny	Jasnobeżowy	Prawie bezbarwny
Lepkość c = 1%, H ₂ O	11 cps	21 cps	Brak danych
Zawartość kwasu guluronowego (%)	39	Brak danych	65 -70
Masa cząsteczkowa [g/m]	80 000 - 120 000	120 000 - 190 000	100 000 - 200 000

¹ Skrót użyte w Publikacji 6

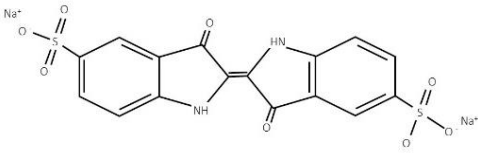
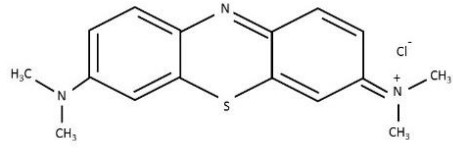
pH c = 1%, H₂O	Brak danych	7.2	6.1
Poziom jakości	200	200	100
Pochodzenie	Algi brunatne	Algi morskie	Algi brunatne
Informacje dodatkowe	Brak danych	Lepkość kinematyczna: 15 - 25 mm ² /s	Odpowiedni do immobilizacji mikroorganizmów

Źródło: Opracowano na podstawie: Białowąs i in. 2024b (**Publikacja 6**)

Barwniki

Jako barwniki modelowe do procesu dekoloryzacji użyto barwnik anionowy: indygo karmin (IC) oraz barwnik kationowy: błękit metylenowy (MB). Właściwości barwników zestawiono w tabeli poniżej (Tabela 2).

Tabela 2 Właściwości testowanych barwników

Nazwa	Indygo karmin	Błękit metylenowy
Skrót nazwy	IC	MB
Wzór chemiczny	C ₁₆ H ₈ N ₂ Na ₂ O ₈ S ₂	C ₁₆ H ₁₈ ClN ₃ S
C.I.	73015	52015
Numer CAS	860-22-0	61-73-4
Masa molowa	466,36 g/mol	319,85 g/mol
Wzór strukturalny		
λ_{max}	610 nm	664 nm

Źródło: Opracowano na podstawie: Białowąs i in. 2024a (**Publikacja 5**)

Odczynniki chemiczne

W badaniach wykorzystano także szereg innych odczynników chemicznych, a informacje szczegółowe zamieszczono w **Publikacjach 4-6**.

5.2 Metody i procedury badawcze

Niniejszy rozdział opisuje metody i procedury badawcze, które zastosowano w badaniach. Z uwagi na to, że w ramach poszczególnych eksperymentów laboratoryjnych badano różne warunki i parametry procesowe, poniżej nakreślono ogólny zakres warunków prowadzonych badań. Metody i procedury badawcze zostały opisane szczegółowo w publikacjach doświadczalnych (**Publikacje 4-6**), które stanowią podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej.

Metoda wytwarzania kapsulek i immobilizacji enzymu przy użyciu biopolimerów

Przetestowano dwie metody wytwarzania kapsulek: 1) przy użyciu atomizera oraz 2) metodę wkraplania za pomocą igły dozującej. Metoda 1 zakładała użycie 3 rodzajów atomizerów o różnych parametrach technicznych (Tabela 3).

Tabela 3 Parametry techniczne atomizerów do otrzymywania mikrokapsulek enzymatycznych

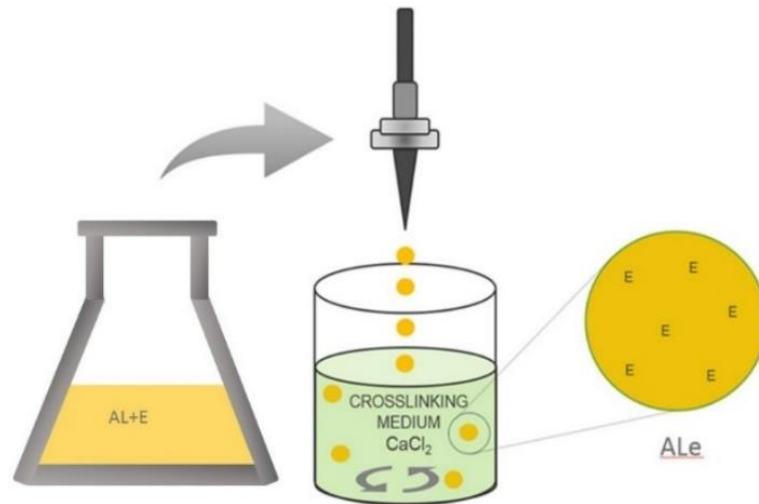
Atomizer	Pojemność zbiornika [ml]	Średnica dyszy [mm]	Ciśnienie robocze [bar]
1a	15	0,5	1-3, 5
1b	500	1,4	3
1c	6000	2,0	3-4

Źródło: Deska i Kończak 2022 (**Publikacja 4**)

W ramach metody 2 kapsułki enzymatyczne przygotowano poprzez wkraplanie przy użyciu dwóch rodzajów urządzeń do kapsulacji składających się ze strzykawki o pojemności zbiornika 5 ml oraz igły dozującej o średnicy otworu 0,45 mm i 0,85 mm.

W celu opracowania kapsulek enzymatycznych przetestowano trzy rodzaje nośników polimerowych – alginian sodu, chitozan oraz nośnik kombinowany alginianowo-chitozanowy. Procedurę przygotowania kapsulek enzymatycznych oraz kapsulek bez enzymu na potrzeby poszczególnych eksperymentów opisano szczegółowo w **Publikacjach 4-6**.

W celu opracowania kapsulek alginianowych z immobilizowaną lakazą wykorzystano roztwór alginianu sodu w wodzie destylowanej w stężeniu 1-3%. Użyty alginian sodu charakteryzował się różną lepkością. Odpowiednią objętość roztworu lakazy (w wodzie destylowanej lub w buforze o pH 5) mieszano z uprzednio przygotowanym roztworem alginianu sodu. Kapsułki enzymatyczne otrzymano wprowadzając roztwór alginianu sodu zawierający lakazę do roztworu sieciującego (2% roztwór CaCl₂) przy użyciu atomizera lub igły dozującej. Kapsułki z immobilizowaną lakazą pozostawiano w roztworze do utwardzenia (15 - 60 min). Następnie oddzielano je za pomocą sitka i trzykrotnie płukano wodą destylowaną i niezwłocznie użyto do dalszych badań. Schemat metody immobilizacji lakazy metodą wkraplania przy użyciu igły dozującej z wykorzystaniem alginianu sodu jako nośnika przedstawiono na rysunku poniżej (Rysunek 2).



Rysunek 2 Immobilizacja lakazy metodą wkraplania

Źródło: Białowas i in. 2024b (**Publikacja 6**)

W celu opracowania kapsułek chitozanowych z immobilizowaną lakazą wykorzystano roztwór chitozanu (w stężeniu 1,5 - 3,0 %) w 5% kwasie octowym. Odpowiednią objętość roztworu lakazy (w wodzie destylowanej) mieszano z roztworem chitozanu i wkraplano do roztworu KOH (1M). Kapsułki chitozanowe pozostawiano w roztworze KOH do utwardzenia (60 min). Następnie oddzielano je za pomocą sitka i trzykrotnie płukano w buforze Gly-NaOH (100 mM, pH 10) i niezwłocznie użyto do dalszych badań.

W celu opracowania kapsułek alginianowo-chitozanowych z immobilizowaną lakazą uprzednio przygotowany roztwór alginianu sodu (2%) zawierający lakazę, wprowadzano do roztworu sieciującego (0,2% (w/o) chitozanu w kwasie octowym (1%) zawierającym CaCl_2 o stężeniu 100 mM). Następnie kapsułki oddzielano za pomocą sitka, trzykrotnie płukano w wodzie destylowanej i niezwłocznie użyto do dalszych badań.

Kapsułki biopolimerowe bez immobilizowanego enzymu zostały opracowane przy użyciu tożsamej metodyki jak dla kapsułek z enzymem, z tym wyjątkiem, że użyty roztwór biopolimeru nie zawierał lakazy.

Oznaczanie aktywności enzymatycznej wolnego enzymu i kapsułek enzymatycznych

Aktywność wolnej, jak i immobilizowanej lakazy na nośniku biopolimerowym mierzono metodą spektrofotometryczną za pomocą spektrofotometru UV-VIS Jasco V-730 (Kraków, Polska) przy użyciu dedykowanego substratu tj. soli diamonowej kwasu 2,2'-azino-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowego) (ABTS) poprzez monitorowanie utleniania ABTS do jego rodnika kationowego (ABTS^+). Pomiary prowadzono przy długości fali $\lambda=420$ nm, w 1 minutowych interwałach czasowych, przyjmując wartość współczynnika absorbancji

$\epsilon_{\max} = 36\ 000\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$. Czas reakcji wynosił 5 min. Jedną jednostkę aktywności lakazy zdefiniowano jako ilość enzymu potrzebną do katalizy 1 μmol substratu (ABTS) w ciągu 1 minuty. Oznaczenia aktywności enzymu wolnego i immobilizowanego posłużyły także do obliczenia wydajności immobilizacji (IY), wg poniższego wzoru:

$$\text{IY (\%)} = \frac{\text{Aktywność całkowita immobilizowanego enzymu}}{\text{Aktywność całkowita wolnego enzymu}} \cdot 100\% \quad (1)$$

Z kolei oznaczenia aktywności lakazy immobilizowanej na nośniku alginianowym umożliwiły obliczenie wskaźnika określonego jako aktywność enzymatyczna względna (RA) w zakresie pH 3, 5, 7. Wskaźnik RA obliczano przyjmując, że aktywność kapsułek wynosi 100% w pH 3. Następnie w pozostałym zakresie pH obliczano aktywność jako odsetek maksymalnej aktywności enzymatycznej.

Określenie parametrów geometrycznych kapsułek

Parametry geometryczne określono dla świeżo przygotowanych kapsułek i kapsułek wysuszonych. W analizach uwzględniono zarówno kapsułki z immobilizowanym enzymem, jak i kapsułki bez enzymu. Wyznaczone parametry charakteryzujące rozmiar i kształt obejmowały: i) długość (L), zdefiniowaną jako odległość między dwoma punktami na obwodzie o największej długości spośród wszystkich możliwych rzutów na główną oś; ii) szerokość (W), zdefiniowaną jako odległość między dwoma punktami na obwodzie o najmniejszej długości spośród wszystkich możliwych rzutów na główną oś; iii) współczynnik kształtu (AR), zdefiniowany jako stosunek długości do szerokości; iv) kulistość (C), zdefiniowaną jako stosunek obwodu koła o powierzchni identycznej z daną cząstką do rzeczywistego obwodu cząstki. Parametr kulistości przyjmuje wartości od 0 do 1, gdzie 1 oznacza idealną kulę. Analizy przeprowadzono dla 5 losowo wybranych kapsułek, pomiary przeprowadzono dla mokrych kapsułek bezpośrednio po ich przygotowaniu i następnie po 10, 20, 30, 40, i 60 minutach, a także po 5 dniach (dla wysuszonych kapsułek).

Potwierdzenie immobilizacji lakazy na nośniku alginianowym

Opracowane kapsułki alginianowe analizowano bezpośrednio po przygotowaniu przy użyciu optycznego analizatora wielkości i kształtu cząstek połączonego ze spektrometrem Ramana (Morphologi G3S-ID, Malvern, Wielka Brytania). Widma Ramana zarejestrowano za pomocą Kaiser Optical System przy długości fali 785 nm (Rockwell Collins Company, USA) i w zakresie spektralnym od $150\ \text{cm}^{-1}$ do $1850\ \text{cm}^{-1}$ z rozdzielczością spektralną $4\ \text{cm}^{-1}$. Analizy dokonano dla kapsułek alginianowych z enzymem i bez enzymu, w celu potwierdzenia obecności enzymu w kapsułkach, zarówno na ich powierzchni, jak i w ich przekroju

poprzecznym. Zarejestrowane widma porównano z widmem substancji referencyjnej, tj. enzymu - lakazy (E) z *Trametes versicolor*.

Testy dekoloryzacji barwników

Roztwory barwników do procesów dekoloryzacji przygotowano przy użyciu wody destylowanej. Testy dekoloryzacji przeprowadzono w szklanych naczyniach, zabezpieczonych przed parowaniem. Dekoloryzacji poddano roztwory błękitu metylenowego, indygo karminu oraz ich mieszaniny. Metodyka dla poszczególnych eksperymentów obejmujących procesy dekoloryzacji została szczegółowo opisana w **Publikacjach 4-6**.

Widma absorpcyjne UV-Vis błękitu metylenowego oraz indygo karminu badano przy użyciu spektrofotometru Jasco V-750 (Jasco, Kraków) w zakresie od 200 do 800 nm. Z tego zakresu wartość absorbancji dla błękitu metylenowego (MB) odczytywano przy długości fali, przy której obserwowano maksymalną absorbancję, tj. $\lambda_{\max} = 664$ nm, a dla indygo karminu (IC) przy długości fali $\lambda_{\max} = 610$ nm.

Skuteczność dekoloryzacji obliczono wg wzoru poniżej:

$$\text{Dekoloryzacja [\%]} = \frac{(A_0 - A_t)}{(A_0 \times 100)} \quad (2)$$

gdzie:

A_0 - początkowa absorbancja mieszaniny reakcyjnej,

A_t - absorbancja po inkubacji mieszaniny reakcyjnej (po dekoloryzacji).

W **publikacji 6** w badaniach obejmujących analizę mechanizmów dekoloryzacji, wprowadzono wskaźnik: **całkowita skuteczność usuwania barwnika** (T_{eff}), obejmujący skuteczność usuwania barwnika przez sorpcję, jak i na drodze biokatalizy. Wskaźnik obliczono wg wzoru poniżej:

$$T_{\text{eff}} = \frac{(A_0 - A_t)}{(A_0 \times 100)} [\%] \quad (3)$$

gdzie:

A_0 - początkowa absorbancja mieszaniny reakcyjnej,

A_t - absorbancja po dekoloryzacji.

Skuteczność sorpcji (S_{eff}), czyli skuteczność usuwania barwnika na drodze sorpcji, określano na podstawie dekoloryzacji roztworu barwnika [%] z wykorzystaniem kapsułek bez immobilizowanego enzymu.

Skuteczność biokatalizy (B_{eff}), czyli skuteczność usuwania barwnika na drodze biokatalizy, obliczano jako różnica pomiędzy T_{eff} a S_{eff} .

Współczynnik sorpcji (SC) został obliczony według wzoru poniżej:

$$SC = \frac{S_{eff} [\%]}{T_{eff} [\%]} \quad (4)$$

gdzie:

S_{eff} - skuteczność sorpcji [%],

T_{eff} – całkowita skuteczność usuwania [%].

W badaniu przyjęto wartość współczynnika SC w zakresie 0 - 1, przy czym jeśli skuteczność sorpcji na kapsułkach alginianowych bez enzymu (S_{eff}) była wyższa niż całkowita skuteczność usuwania (T_{eff}), wówczas wartość SC przyjmowano jako 1.

Wyniki uzyskane w ramach przeprowadzonych eksperymentów zostały wyrażone jako wartości średnie z trzech powtórzeń z odchyleniem standardowym.

Oznaczenia lepkości roztworów alginianów

Do badania lepkości wykorzystano kubek Forda. Badanie polegało na pomiarze czasu wypływu roztworu alginianu przez otwór wypływowy o średnicy 4 mm. Badanie prowadzono dla 3 rodzajów alginianu sodu o stężeniu 2% w temperaturze 21°C (+/- 0,5°C) oraz 30°C (+/- 0,5°C). Badanie prowadzono w 3 powtórzeniach. Jako wynik przyjęto średnią arytmetyczną dwóch wybranych oznaczeń nie różniących się więcej niż 5% od ich średniej wartości.

Testy toksyczności

Testy toksyczności przeprowadzono zgodnie z technologią Microtox, na urządzeniu Microtox® model 500 (Modern Water, USA) z wbudowanym fotometrem, kontrolą temperatury i funkcjami autokalibracji oraz przy użyciu procedury zalecanej przez US EPA do testowania toksyczności próbek środowiskowych - Whole Effluent Toxicity Test (WET). System Microtox współpracuje z wybranym szczepem morskich bakterii luminescencyjnych *Allivibrio fischeri*, który jest wrażliwy na szerokie spektrum substancji toksycznych. Bakterie luminescencyjne wytwarzają światło w zakresie widzialnym w wyniku ich normalnych procesów metabolicznych. Zmiana metabolizmu po ekspozycji na działanie próbki testowej wywołuje reakcję, którą jest zmiana intensywności wytwarzanego światła. Z uwagi na to, że próbki testowe były zabarwione, dokonano odpowiednio korekcji pomiaru luminescencji (przy użyciu oprogramowania MicrotoxOmni dostarczonego przez producenta systemu Microtox) podczas rzeczywistego testu toksyczności. Po 15 minutach ekspozycji mierzono intensywność bioluminescencji w stosunku do próbki kontrolnej zawierającej jedynie 2% roztwór NaCl.

Próbki roztworów początkowych oraz ich rozcieńczenia testowano w 3 powtórzeniach, z kolei próbki poprocesowe w 4 powtórzeniach.

5.3 Zmienne i wskaźniki

Zmienne:

- stężenie biopolimeru (%),
- dawka enzymu do degradacji barwnika (mg E/mg B),
- temperatura (°),
- lepkość alginianu sodu (mm^2/s),
- stężenie barwnika (mg/L),
- czas reakcji (t),
- pH,
- parametry geometryczne kapsulek: długość (L), szerokość (W), współczynnik kształtu (AR), kłistość (C).

Wskaźniki (badane parametry):

- dekoloryzacja (%),
- całkowita skuteczność usuwania barwnika (T_{eff}) (%),
- skuteczność biokatalizy (B_{eff}) (%),
- skuteczność sorpcji (S_{eff}) (%),
- wydajność immobilizacji (IY, immobilization yield) (%),
- aktywność enzymatyczna (RA, relative activity) (%),
- współczynnik sorpcji (SC),
- inhibicja bioluminescencji.

6 WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

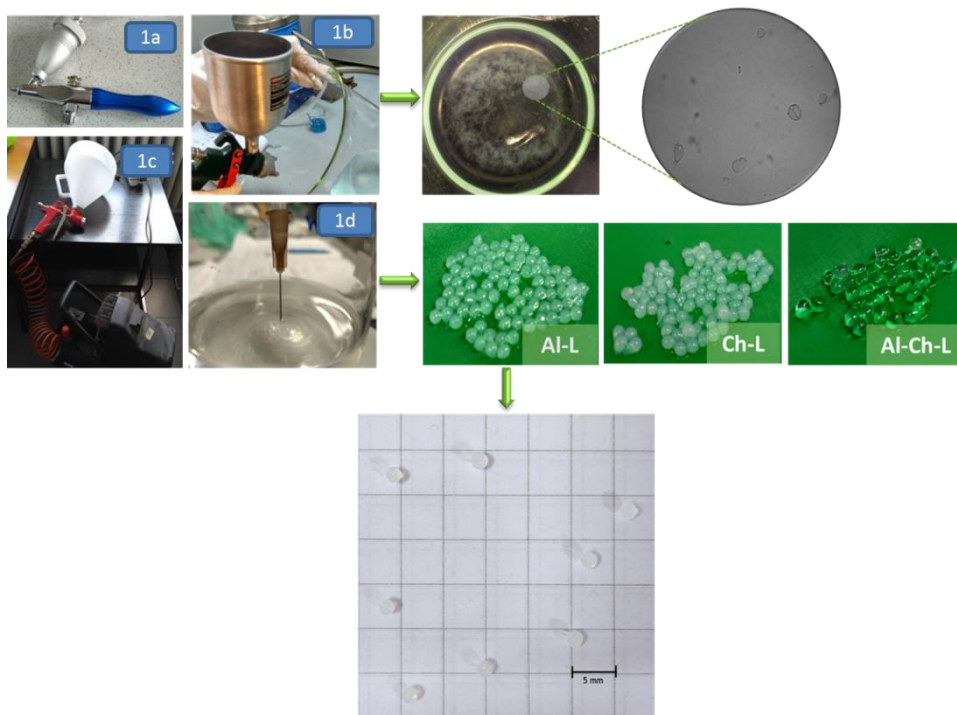
Rozprawa doktorska ma formę cyklu artykułów naukowych, w skład którego wchodzi 6 publikacji, w tym 3 artykuły oryginalne (**Publikacje 4-6**). Wyniki badań zawarte w 3 oryginalnych artykułach naukowych opisano w rozdziałach poniżej.

6.1 Immobilizacja lakazy na nośnikach biopolimerowych (**Publikacja 4**)

Celem badań przedstawionych w **Publikacji 4** było **opracowanie kapsulek enzymatycznych, w tym dobór rodzaju nośnika i jego stężenia, metody immobilizacji, stężenia enzymu, tak by pozyskać kapsułki enzymatyczne do potencjalnego zastosowania w usuwaniu barwników ze ścieków**. Ważnym parametrem kapsulek enzymatycznych jest ich

stabilność w warunkach przechowywania. Stąd też w ramach niniejszych badań **określono także warunki przechowywania kapsułek z immobilizowaną lakazą, co ma istotne znaczenie dla potencjalnego, praktycznego zastosowania.**

W celu uzyskania kapsułek z immobilizowaną lakazą przetestowano dwie metody immobilizacji: 1) metodę kapsulacji przy użyciu atomizera (3 rodzaje atomizerów o różnych parametrach technicznych) oraz 2) metodę wkraplania przy użyciu wkraplacza z igłą dozującą (Rysunek 3), wykorzystując trzy rodzaje nośników biopolimerowych: alginian sodu, chitozan oraz nośnik kombinowany alginianowo-chitozanowy. Kapsułki o średnicy około 2 - 3 mm (kapsułki mokre) i powtarzalnych parametrach geometrycznych uzyskano metodą wkraplania przy użyciu wkraplacza - strzykawka o pojemności 5 ml z igłą dozującą o średnicy 0,45 mm.



Rysunek 3 Metody immobilizacji lakazy: 1a) atomizer \varnothing 0,5 mm; 1b) atomizer \varnothing 1,4 mm; 1c) atomizer \varnothing 2,0 mm, 1d) wkraplacz z igłą dozującą \varnothing 0,45 mm

Źródło: Deska i Kończak 2022 (**Publikacja 4**)

Jeden z elementów badań w ramach **Publikacji 4** stanowiło określenie aktywności enzymatycznej wolnej i immobilizowanej lakazy. Aktywność enzymatyczną oznaczano metodą spektrofotometryczną przy użyciu dedykowanej soli ABTS. Oznaczenie aktywności enzymu wolnego i immobilizowanego posłużyło do obliczenia wskaźnika wydajności immobilizacji (IY). Rozpatrując zalety stosowania immobilizowanych enzymów należy mieć na uwadze, że stosowanie wolnej lakazy w procesach technologicznych, w tym do usuwania barwników ze

ścieków, wiąże się z istotnymi ograniczeniami, jak np. utrata aktywności wynikająca z wysokiej wrażliwość białka enzymatycznego na warunki środowiska reakcji, brak możliwości oddzielenia enzymu od mieszaniny reakcyjnej, a także jego niska stabilność podczas przechowywania, co znacznie ogranicza zarówno efektywność samego procesu, jak i praktyczną możliwość ponownego wykorzystania enzymu w procesie technologicznym (Jafri i in. 2021). W celu określenia wydajności katalitycznej enzymów wykorzystuje się równanie Michaelisa-Menten:

$$v = \frac{v_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad (5)$$

gdzie,

v_{max} - maksymalna szybkość reakcji,

[S] - stężenie substratu,

K_M - stała Michaelisa.

Stała Michaelisa K_M określa stężenie substratu, przy którym szybkość reakcji enzymatycznej osiąga połowę wartości szybkości maksymalnej. Stała ta jest zatem miarą powinowactwa enzymu do substratu, przy czym wyższe wartości K_M wskazują na niskie powinowactwo enzymu do substratu, z kolei niskie wartości K_M wysokie powinowactwo (Zhou i in. 2021). Immobilizacja enzymów może skutkować ich mniejszym powinowactwem do substratu, wynikającym ze zmiany konformacji białka enzymatycznego, a także z powodu utrudnionego dostępu do jego centrum aktywnego, modyfikacji grup funkcyjnych w centrum katalitycznym lub też z wewnętrznego oporu dyfuzyjnego transportu masy do/od jego centrum aktywnego. Powyższe wnioski potwierdzają doniesienia literaturowe dotyczące analizy kinetyki przemiany enzymatycznej przez lakazę wolną i immobilizowaną, w których wykazano, że enzymy immobilizowane mają wyższą wartość K_M (Mohammadi i in. 2018, Ratanapongleka i Punbut 2018, Brugnari i in. 2020). Z drugiej jednak strony, co jest bardzo istotne w kontekście katalitycznej degradacji zanieczyszczeń, **mniejsze powinowactwo wiąże się z dłuższym czasem działania, co z kolei przekładać się może na bardziej stabilne warunki pracy reaktorów z immobilizowanymi enzymami i większą odporność na zmiany stężenia substratu niż w przypadku wolnych lakaz.**

Wyniki badań w ramach **Publikacji 4** pozostają w zgodzie z wnioskiem powyżej, **czas działania enzymów immobilizowanych jest dłuższy niż czas działania wolnych enzymów. Stanowi to cenną informację w kontekście możliwości praktycznego wykorzystania enzymów immobilizowanych w usuwaniu związków trudnorozkładalnych,**

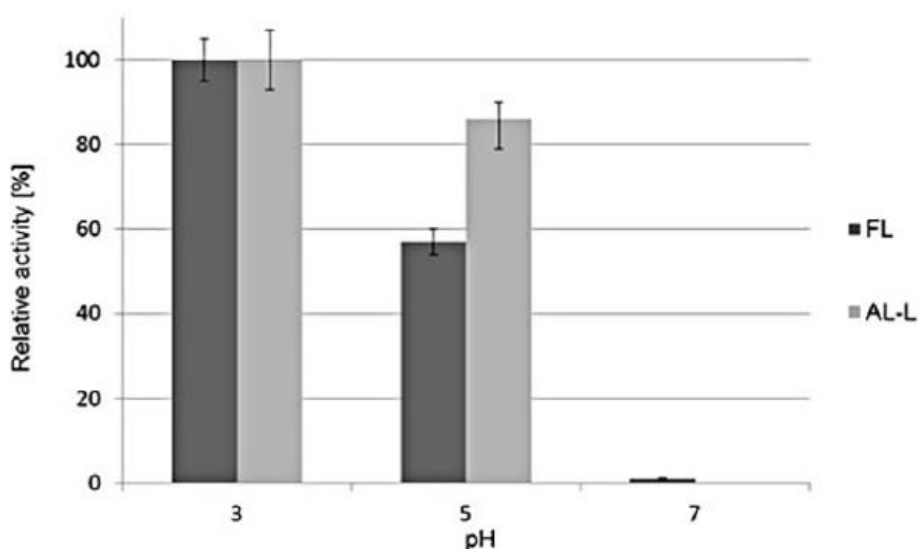
w tym barwników. Szybki rozkład takich związków może prowadzić do powstawania metabolitów posiadających wyższą toksyczność od samych rozkładanych związków. Zatem potencjalnie wydłużenie czasu reakcji daje możliwość rozkładu także metabolitów pośrednich do prostych i nietoksycznych produktów końcowych (Gahlout i in. 2017).

Uzyskane wyniki badań wskazują, iż w wyniku immobilizacji lakazy nastąpił spadek jej aktywności w porównaniu do aktywności enzymu natywnego (IY=33,6%). Najwyższą aktywność enzymatyczną posiadał enzym immobilizowany na nośniku alginianowo-chitozanowym, dla którego uzyskano około 77% wydajności immobilizacji. Jednak podczas prowadzonych badań kapsułki enzymatyczne na bazie tego nośnika zbyt łatwo ulegały pęknięciom i uszkodzeniom. Lakaza immobilizowana na nośniku chitozanowym nie wykazała aktywności enzymatycznej, co mogło być wynikiem przestrzennego ograniczenia dostępności substratu, wynikającego z trwałego, gęstego usieciowania chitozanu. Wyniki uzyskane w **Publikacji 4** są zbieżne z wynikami innych badaczy w tym zakresie. Po immobilizacji enzym wykazał niższą aktywność, co mogło wynikać ze zjawiska dyfuzji lub wystąpienia niespecyficznych interakcji i zmian w mikrośrodkowisku, jakie tworzy otoczka alginianowa. Wydajność immobilizacji zależy również od wielu czynników, m.in. od rodzaju nośnika do immobilizacji, w tym jego właściwości fizyko-chemicznych oraz zastosowanych technik immobilizacji, a także interakcji pomiędzy cząsteczką enzymu a nośnikiem (Sathishkumar i in. 2014). **Uzyskane wyniki skłoniły mnie do pogłębionej analizy w obszarze właściwości fizyko-chemicznych alginianu do immobilizacji lakazy, a w szczególności rozpoznania kwestii obejmujących wpływ lepkości na skuteczność dekoloryzacji, co uczyniono w Publikacji 6.**

W ramach badań wstępnych opisanych w **Publikacji 4** dokonano oceny stopnia sorpcji błękitu metylenowego (MB) w stężeniu 25 mg/L przez kapsułki polimerowe bez immobilizowanego enzymu, w temperaturze 30 i 40°C przez 28 h. Najniższy stopień sorpcji MB wykazały kapsułki chitozanowe, odpowiednio 29,7% w 30°C oraz 41,7% w 40°C. Prawdopodobnie wynika to ze zwartej struktury usieciowanego polimeru, mniejszej porowatości, co jednocześnie mogło skutkować brakiem aktywności enzymatycznej kapsułek na bazie chitozanu. Wzrost temperatury o 10°C spowodował wzrost sorpcji barwnika przez kapsułki chitozanowe o ponad 10%, co może wynikać z rozluźnienia struktury polimeru, w konsekwencji umożliwiając sorpcję większej ilości barwnika przez kapsułki. Z kolei zarówno dla kapsułek alginianowych (AL) jak i alginianowo-chitozanowych (AL-Ch) wzrost temperatury spowodował niższą sorpcję barwnika, co może wynikać z oddziaływania temperatury na strukturę kapsułek, w wyniku czego staje się ona mniej zwarta. **Uzyskane**

wyniki stanowią istotny wkład wiedzy w zakresie potencjalnego zastosowania kapsulek polimerowych w procesach dekoloryzacji na drodze sorpcji na biopolimerowym materiale nośnikowym.

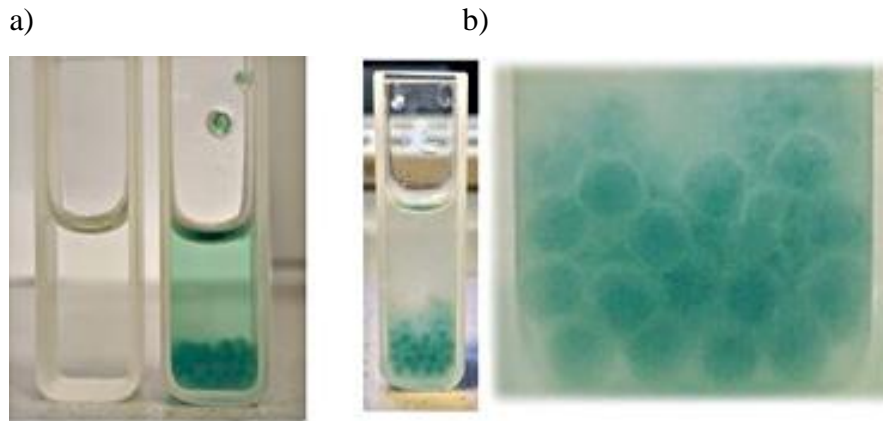
Przeprowadzono także wstępne testy dotyczące wpływu pH (inkubacja 15 min w temp. 21°C; pH 3, 5 i 7) i temperatury (21, 25, 30, 40, 50 i 60°C) na aktywność immobilizowanej lakazy przy użyciu alginianu sodu (AL-L), jak i na aktywność enzymu w formie natywnej (FL). Lakaza, zarówno w formie immobilizowanej, jak i natywnej wykazała najwyższą aktywność przy pH 3, przy czym w pH 5 nastąpił nieznaczny spadek aktywności immobilizowanej lakazy o około 18%, z kolei dla wolnej lakazy o około 45% (Rysunek 4).



Rysunek 4 Wpływ pH na aktywność wolnej (FL) i immobilizowanej lakazy przy użyciu alginianu sodu (AL-L)

Źródło: Deska i Kończak 2022 (**Publikacja 4**)

Interesującym jest, że w pH 7 wolna lakaza wykazała znikomą aktywność wynoszącą około 2%, przy czym lakaza immobilizowana nie wykazała aktywności enzymatycznej. Należy jednak zauważyć, że podczas prowadzenia eksperymentu zaobserwowano, że wewnątrz kapsulek enzymatycznych zabarwiło się na zielono, co wynika z obecności produktu utleniania ABTS przez enzym wewnątrz kapsułki (Rysunek 5a, 5b). Świadczy to o tym, że utlenianie ABTS przez enzym zachodziło tylko wewnątrz kapsułki enzymatycznej, stąd w roztworze badanej próbki nie stwierdzono aktywności lakazy.



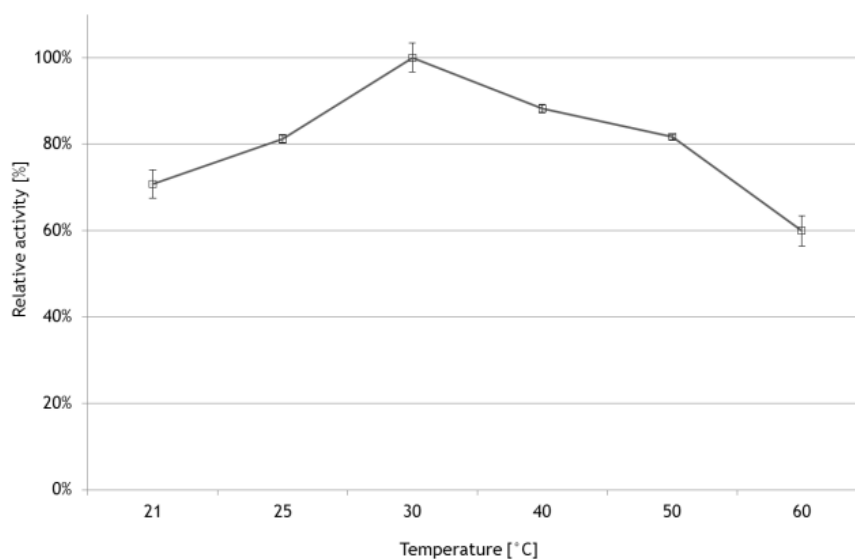
Rysunek 5 Utlenianie ABTS przez alginianowe kapsułki enzymatyczne w a) pH 5, b) pH 7

Źródło: Deska i Kończak 2022 (**Publikacja 4**)

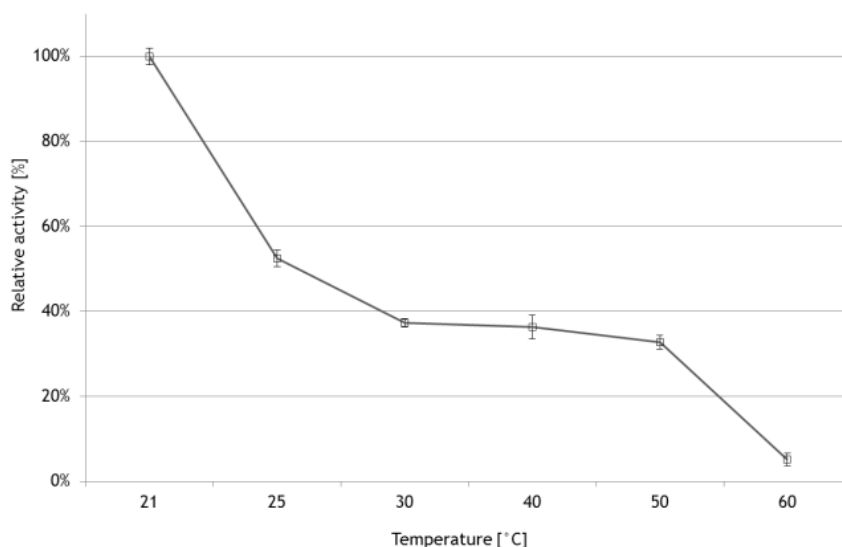
Na podstawie uzyskanych wyników badań można stwierdzić, że kapsułka alginianowa stanowi swego rodzaju barierę ochronną dla immobilizowanego enzymu, chroniąc go przed negatywnym działaniem wysokiego pH. We wnętrzu kapsułki tworzy się mikrośrodowisko, które zapewnia stabilne warunki dla działania enzymu. Użyty do immobilizacji nośnik, a dalej jego specyficzne właściwości fizyko-chemiczne, stanowią jeden z kluczowych czynników dla uzyskania wysokiej efektywności immobilizowanych enzymów. **Istotne jest, aby nośnik alginianowy stanowił barierę ochronną dla enzymu, ale jednocześnie jego struktura po usieciowaniu umożliwiła kontakt lakazy z danym zanieczyszczeniem, które ma podlegać biodegradacji. Zatem dla odpowiedniego zrównoważenia procesów sorpcji, jak i biokatalizy, ale jednocześnie odpowiedniego zabezpieczenia enzymu w niekorzystnych warunkach środowiska reakcji, istotne jest zbadanie kwestii właściwości samego nośnika. Zatem w kolejnych badaniach podjęto próbę oceny możliwości zastosowania nośników alginianowych o różnej lepkości do immobilizacji lakazy do procesów usuwania barwników syntetycznych.**

Testy wstępne obejmujące ocenę wpływu temperatury (temperatura: 21 - 60°C, czas inkubacji w wodzie destylowanej: 15 min) na aktywność enzymu immobilizowanego, jak i w formie wolnej wykazały, że enzym w formie wolnej posiadał najwyższą aktywność w temperaturze 30°C, z kolei w przypadku aktywności enzymatycznej kapsułek uprzednio inkubowanych w wodzie destylowanej w zadanej temperaturze, wraz ze wzrostem temperatury inkubacji obserwowano spadek aktywności enzymatycznej (Rysunek 6a,b).

a)



b)



Rysunek 6 Aktywność a) wolnej lakazy (FL) oraz b) immobilizowanej lakazy (AL-L) w temperaturze 21 - 60°C

Źródło: Deska i Kończak 2022 (**Publikacja 4**)

Żele alginianowe są miękkimi, lepkosprężystymi układami, które odkształcają się w odpowiedzi na bodźce zewnętrzne ze względu na obecność wody w ich sieci żelowej. Rodzaj alginianu i charakterystyczna dla niego masa cząsteczkowa, stosunek monomerów G/M, mają istotny wpływ na właściwości reologiczne opracowanego żelu. Bardziej elastyczne żele tworzone są z alginianu o wysokiej zawartości bloków M ($M/G > 1$), podczas gdy żele otrzymywane z alginianu o niskim stosunku M/G ($M/G < 1$) są bardziej zwarte, twarde i kruche. Kolejność sztywności łańcucha można określić jako: $MG < MM < GG$ (Abka-Khajouei i in.

2022). Ponadto na właściwości reologiczne żeli alginianowych może mieć wpływ również temperatura. Wraz ze wzrostem temperatury, elastyczność żelu zmniejsza się, stając się bardziej lepkiem, aż do upłynnienia (w temp. 90°C) (Khajouei i in. 2021). Inkubacja kapsułek enzymatycznych w wodzie destylowanej w wyższych temperaturach mogła spowodować zmianę struktury kapsułek w wyniku czego nastąpiło szybsze uwolnienie enzymu do wody. Wolny enzym jest wrażliwy na podwyższone pH, dlatego nie obserwowano dekoloryzacji barwnika, w procesie prowadzonym w pH7. Natomiast ciemnozielone zabarwienie utlenionego ABTS w kapsułce świadczy o tym, że otoczka alginianowa tworzy zbuforowane środowisko dla aktywności enzymu wewnątrz kapsułki. **Ważne jest, aby otoczka alginianowa stanowiła zabezpieczenie enzymu przed niekorzystnymi warunkami procesu, a jednocześnie struktura usieciowanego alginianu umożliwiła działanie enzymu i rozłożenie zanieczyszczenia. Zatem właściwości, w tym lepkość alginianu jest istotnym parametrem warunkującym efektywność kapsułek enzymatycznych.** Alginiany o niższej lepkości posiadają więcej bloków M są bardziej elastyczne, z drugiej strony, alginiany o wyższej lepkości i większej zawartości bloków G stosowane są do otrzymywania bardziej odpornych żeli (Bertagnolli i in. 2014).

Potencjalne przemysłowe zastosowanie immobilizowanych enzymów będzie mogło wymagać ich okresowego przechowywania, dlatego też przeprowadzono testy wpływu warunków przechowywania na aktywność enzymatyczną opracowanych kapsułek. Kapsułki enzymatyczne przechowywano w: 1) wodzie destylowanej oraz 2) bez nośnika wody i bez dostępu powietrza, w temperaturze 21°C, 4°C i -10°C. **Wyniki badań wykazały, że najlepszą metodą przechowywania kapsułek jest przechowywanie w warunkach suchych (bez nośnika wody) i bez dostępu powietrza, w temperaturze 4°C. Przechowywane w ten sposób kapsułki, po 21 dniach zachowały około 75% początkowej aktywności enzymatycznej.** Przechowywanie kapsułek w wodzie w temperaturze 21°C oraz w temperaturze -10°C skutkowało utratą blisko 90% aktywności, przy czym największa utrata aktywności następowała w 1 dniu eksperymentu. Kapsułki przechowywane w temperaturze 4°C zachowały około 36% aktywności początkowej po 21 dniach.

Dodatkowy element badań stanowiła ocena wpływu powolnego suszenia niskotemperaturowego (5h, 30°C) na aktywność enzymatyczną preparatów enzymatycznych na bazie alginianu sodu. Po wysuszeniu enzymatyczne kapsułki alginianowe wykazywały mniej regularny, nieco spłaszczony kształt. Jednak, co istotne, ich aktywność enzymatyczna wzrosła blisko dwukrotnie w stosunku do mokrych kapsułek analizowanych bezpośrednio po przygotowaniu. **Uzyskane wyniki wskazują na potencjalną możliwość wykorzystania**

suszenia niskotemperaturowego jako obiecującej metody przygotowania kapsulek enzymatycznych do dalszego przechowywania, jak również do maksymalizacji ich efektywności.

Podsumowując, badania przeprowadzone w ramach **Publikacji 4** dotyczyły oceny możliwości zastosowania różnych nośników biopolimerowych do immobilizacji lakazy z *Trametes versicolor*. Wydajność immobilizacji lakazy dla 3 rodzajów analizowanych nośników obliczono na podstawie aktywności wolnej i immobilizowanej lakazy. Najwyższą aktywność enzymatyczną posiadał enzym immobilizowany na nośniku alginianowo-chitozanowym, dla którego uzyskano około 77% wydajności immobilizacji. Jednak podczas prowadzonych badań kapsułki enzymatyczne na bazie tego nośnika zbyt łatwo ulegały pęknięciom i uszkodzeniom, stąd **metoda wkraplania z użyciem nośnika - alginianu sodu (2%) okazała się najskuteczniejszą techniką immobilizacji enzymu przy wydajności immobilizacji $IY=33,6\%$. Istotny jest także czas działania enzymów immobilizowanych, który jest dłuższy w porównaniu do enzymu wolnego.** Szybki rozkład zanieczyszczeń może prowadzić do powstawania metabolitów o wyższej toksyczności od samych rozkładanych związków. **Stanowi to cenną informację w kontekście możliwości praktycznego wykorzystania enzymów immobilizowanych w usuwaniu związków trudnorozkładalnych, w tym barwników.** Na podstawie uzyskanych wyników dotyczących wpływu pH na aktywność wolnej i immobilizowanej lakazy można stwierdzić, że **kapsułka alginianowa stanowi swego rodzaju barierę ochronną dla immobilizowanego enzymu, chroniąc go przed negatywnym działaniem wysokiego pH, tworząc wewnątrz kapsułki stabilne mikrośrodowisko dla działania enzymu.** Testy obejmujące ocenę wpływu warunków przechowywania na aktywność immobilizowanej lakazy wykazały, że **przechowywanie kapsulek enzymatycznych w niższej temperaturze (4°C), bez nośnika wody pozwoliło na zachowanie około 75% aktywności początkowej immobilizowanego enzymu w ciągu 21 dni. Ponadto wskazano na możliwość wykorzystania suszenia niskotemperaturowego jako obiecującej metody przygotowania kapsulek enzymatycznych do dalszego przechowywania, jak również do maksymalizacji ich efektywności.**

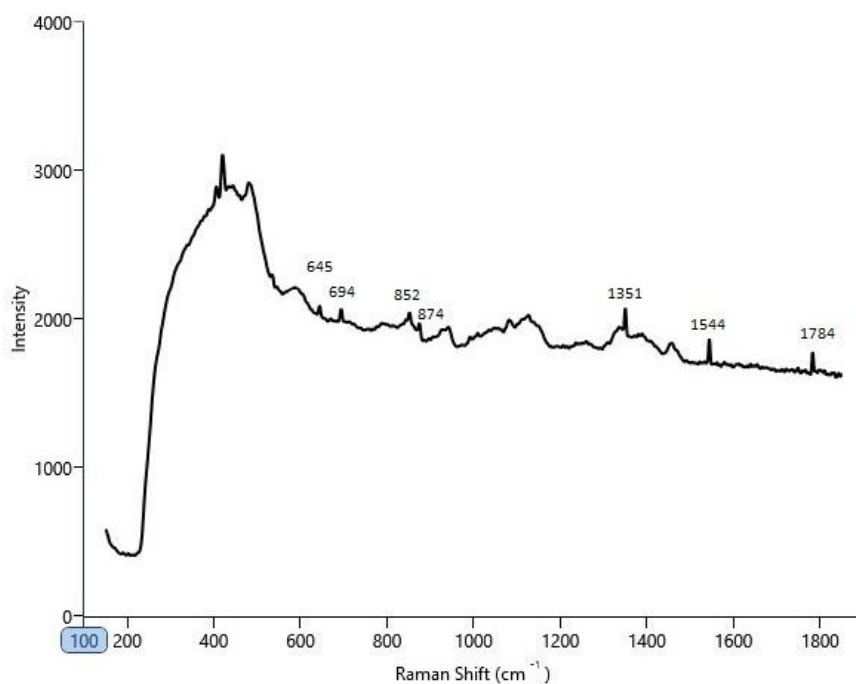
Wyniki uzyskane w ramach niniejszych badań wstępnych stanowią cenny wkład w dalsze badania w kontekście założonego procesu badawczego dotyczącego opracowania technologii immobilizacji lakazy na nośnikach biopolimerowych do usuwania barwników ze ścieków. Pozyskana wiedza pozwoliła na przeprowadzenie kolejnych badań w obszarze możliwości zastosowania nośników alginianowych do immobilizacji lakazy, koncentrując się na ich właściwościach, w tym lepkości.

6.2 Immobilizowana lakaza na nośniku biopolimerowym w dekoloryzacji indygo karminu (**Publikacja 5**)

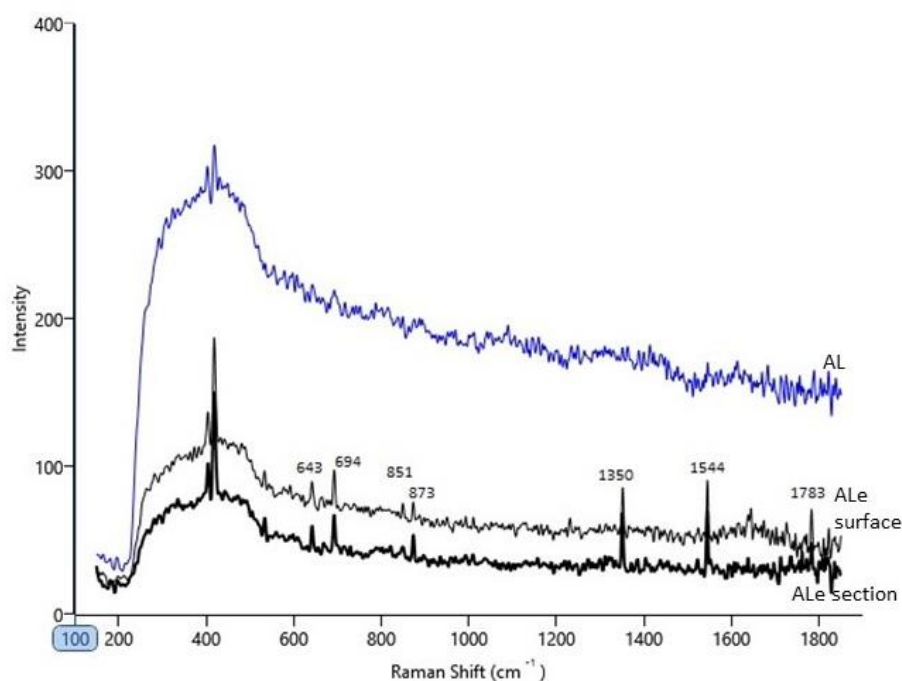
Badania przeprowadzone w ramach **Publikacji 4** koncentrowały się na ocenie możliwości zastosowania różnych nośników, w tym alginianu sodu, chitozanu, jak i nośnika kombinowanego na bazie powyższych, do immobilizacji lakazy do potencjalnego zastosowania w usuwania barwników. Na podstawie wyników opisanych w **Publikacji 4**, w ramach dalszych badań, opisanych w **Publikacji 5**, do immobilizacji lakazy zastosowano 2% alginian sodu. Kontynuację zamierzeń badawczych stanowiła **ocena potencjału zastosowania alginianu sodu jako nośnika do immobilizacji lakazy w procesie dekoloryzacji barwników na przykładzie indygo karminu**. Uzyskane wyniki wykazały, że metoda wkraplania z użyciem alginianu sodu (2%) umożliwiła opracowanie kapsułek enzymatycznych posiadających kulisty kształt i średnicę około 2 mm, a immobilizacja enzymu została potwierdzona metodą spektroskopii Ramana. Kolejnym krokiem badawczym była ocena możliwości zastosowania w ten sposób opracowanych kapsułek enzymatycznych do dekoloryzacji roztworu barwnika indygo karminu. Wśród mechanizmów usuwania barwników za pomocą enzymów unieruchomionych na biopolimerach wyróżnia się sorpcję i biotransformację/biokatalizę (Daâssi i in. 2014). **Nowością badań przeprowadzonych w ramach Publikacji 5 było dokonanie charakterystyki opracowanych preparatów enzymatycznych poprzez określenie parametrów geometrycznych kapsułek z immobilizowaną lakazą, jak i kapsułek bez enzymu, potwierdzenie immobilizacji lakazy na nośniku za pomocą spektroskopii Ramana, a także w szczególności optymalizacja warunków procesu dekoloryzacji indygo karminu (IC) (barwnik anionowy), poprzez dobór dawki enzymu na 1 mg barwnika, określenie optymalnej temperatury procesu, a także identyfikacja mechanizmu dekoloryzacji IC.**

Immobilizację lakazy przy użyciu alginianu sodu jako nośnika potwierdzono za pomocą spektroskopii Ramana. W widmie substancji referencyjnej: enzymu (E) zidentyfikowano charakterystyczne piki przy 645 cm^{-1} , 694 cm^{-1} , 852 cm^{-1} , 874 cm^{-1} , 1351 cm^{-1} , 1544 cm^{-1} i 1784 cm^{-1} . Piki te występowały również w widmach zarejestrowanych dla kapsułek enzymatycznych (zarówno na przekroju jak i na powierzchni), ale nie były obecne w widmie zarejestrowanym dla kapsułek bez immobilizowanego enzymu (Rysunek 7).

a)



b)

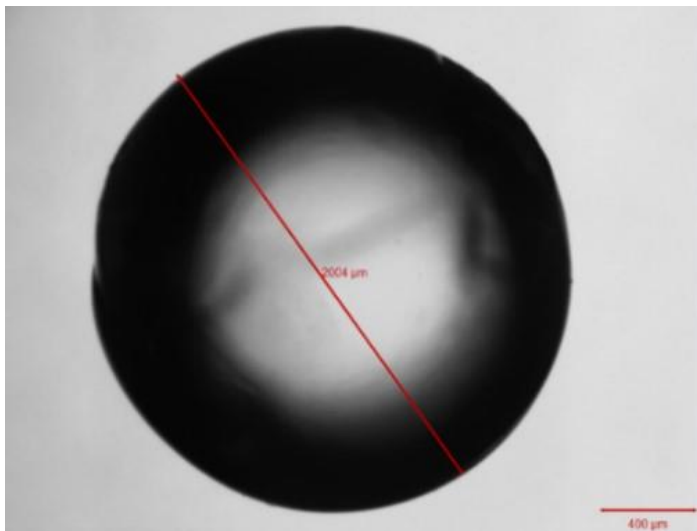


Rysunek 7 Widma Ramana zarejestrowane dla: a) enzymu lakazy (w postaci proszku) (E), czas ekspozycji 10 s, b) kapsułek alginianowych bez enzymu (AL) oraz powierzchni kapsułek alginianowych z lakazą (ALe surface) i przekroju poprzecznego kapsułek alginianowych z lakazą (ALe section), czas ekspozycji 5 s.

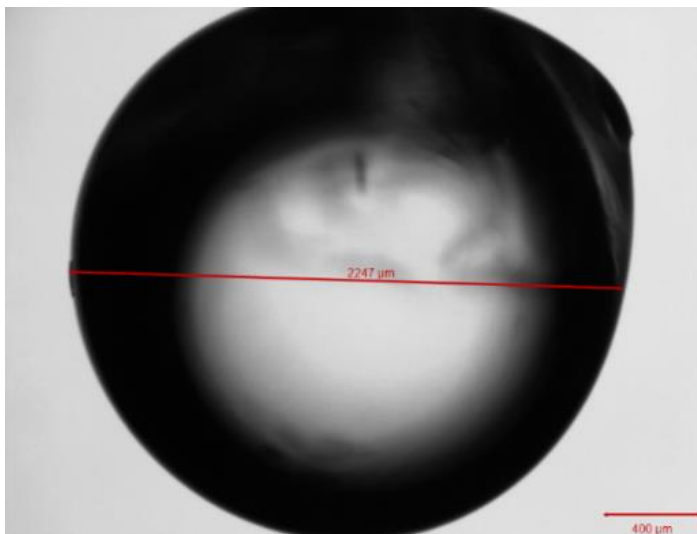
Źródło: Białowas i in. 2024a (**Publikacja 5**)

W celu uzyskania pogłębionej wiedzy dotyczącej parametrów geometrycznych opracowanych kapsułek enzymatycznych na bazie alginianu sodu, jak i kapsułek bez enzymu dokonano analizy ich kształtu poprzez określenie następujących zmiennych: długość (L), szerokość (W) współczynnik kształtu (AR), kolistość (C). Analizy parametrów geometrycznych rozpoczynano bezpośrednio po przygotowaniu kapsułek, powtarzając pomiary do 60 minuty, a następnie po 5-dniowym suszeniu kapsułek w temperaturze $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, przy wilgotności powietrza 51,0%. Na rysunkach poniżej przedstawiono fotografie kapsułek (Rysunek 8), a także zmiany parametrów opisujących rozmiar i kształt kapsułek w funkcji czasu suszenia (Rysunek 9).

a)

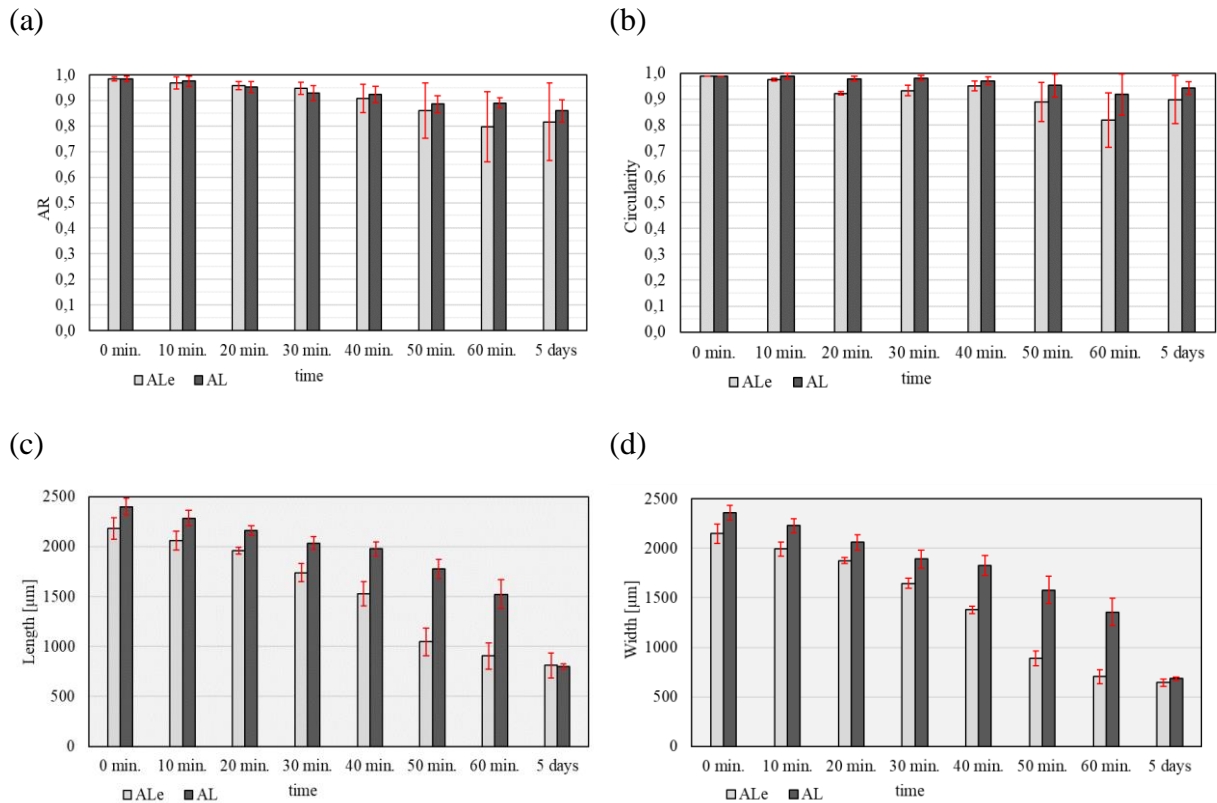


b)



Rysunek 8 Kapsułka bezpośrednio po przygotowaniu a) kapsułka alginianowa z enzymem (ALe), b) kapsułka alginianowa bez enzymu (AL)

Źródło: Białowas i in. 2024a (**Publikacja 5**)



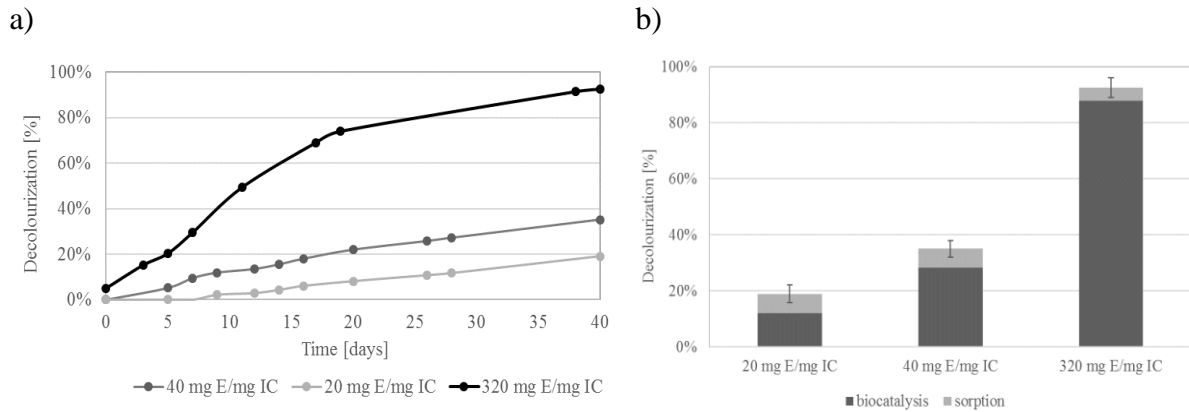
Rysunek 9 Zmiany parametrów geometrycznych kapsulek alginianowych z enzymem (ALe) i bez enzymu (AL) w funkcji czasu: a) współczynnik kształtu, b) kolistość c) długość, d) szerokość

Źródło: Białowas i in. 2024a (**Publikacja 5**)

Kapsułki AL i ALe analizowane bezpośrednio po przygotowaniu miały średnią długość odpowiednio 2400 μm i 2183 μm oraz szerokość 2360 μm i 2148 μm , wykazywały kształt bardzo zbliżony do kulistego, co potwierdza parametr określany jako kolistość (C), wynoszący średnio 0,99 i parametr współczynnika kształtu (AR) wynoszący średnio 0,98. Po wysuszeniu (czas: 5 dni, temperatura: $22^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, wilgotność: 51,0%) kapsułki AL i ALe miały średnią długość odpowiednio 798 μm i 811 μm oraz szerokość 685 μm i 653 μm , przy czym parametry C i AR wynosiły dla kapsulek bez enzymu $C=0,93$, $AR=0,85$ i z enzymem $C=0,90$, $AR=0,80$. Długość kapsulek po wysuszeniu zmniejszyła się o ponad 60%, z kolei szerokość o około 70%, w stosunku do kapsulek analizowanych bezpośrednio po przygotowaniu.

Głównym celem badań w ramach **Publikacji 5** była optymalizacja procesu dekoloryzacji indygo karminu (IC) poprzez dobór odpowiedniej dawki immobilizowanego enzymu na 1 mg barwnika oraz temperatury procesu, a także identyfikacja głównych mechanizmów dekoloryzacji. Testy dekoloryzacji IC prowadzono w temperaturze pokojowej (21°C) dla następujących dawek enzymu: 20 mg E/mg IC, 40 mg E/mg IC i 320 mg E/mg IC przez 40 dni. **Przeprowadzone testy dekoloryzacji IC przy użyciu opracowanych kapsulek**

alginianowych z immobilizowaną lakazą, z zastosowaniem dawki enzymu 320 mg E/1 mg IC umożliwiły usunięcie 92,5% barwnika w ciągu 40 dni (Rysunek 10a), przy czym 87,77% barwnika zostało usunięte na drodze biokatalizy (Rysunek 10b). Uzyskane wyniki wskazują, że biokataliza jest dominującym mechanizmem w usuwaniu IC (barwnika anionowego).



Rysunek 10 Skuteczność dekoloryzacji indygo karminu przy użyciu kapsułek alginianowych z immobilizowaną lakazą a) dla różnych dawek enzymu na 1 mg barwnika IC w ciągu 40 dni w 21°C, b) z identyfikacją dominującego mechanizmu dekoloryzacji

Źródło: Białowas i in. 2024a (**Publikacja 5**)

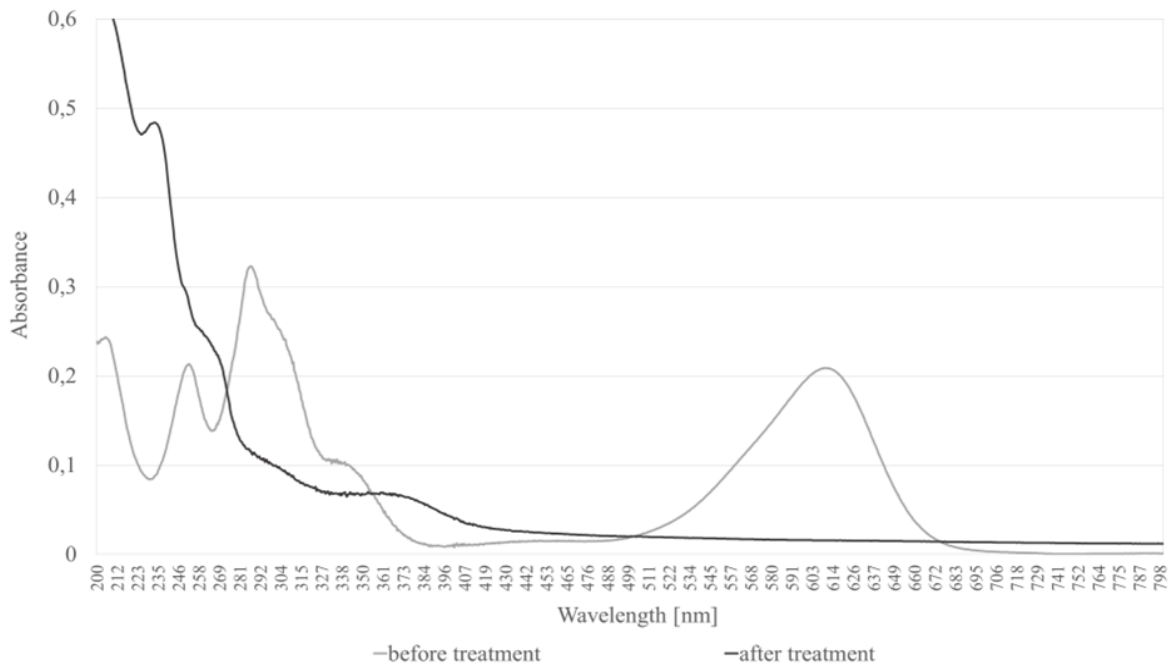
Należy zauważyć, że im wyższa zastosowana dawka enzymu na 1 mg IC, tym bardziej przeważał mechanizm biokatalizy nad sorpcją. Przy najniższej testowanej dawce enzymu (20 mg E/mg IC) biokataliza stanowiła 63,16% całkowitego usunięcia barwnika, podczas gdy dla dawki 320 mg E/mg IC stanowiła blisko 95%. Wartość współczynnika sorpcji zmniejszała się wraz ze wzrostem dawki enzymu na 1 mg IC. Przy niskich dawkach enzymu następuje szybkie wysycenie enzymu barwnikiem, co prowadzi do wyższego stopnia sorpcji barwnika przez kapsułkę alginianową (współczynnik sorpcji 0,36 dla dawki 20 mg E/mg IC). Przy wyższych dawkach enzymu, współczynnik sorpcji jest niższy (0,05 dla dawki 320 mg E/mg IC), bowiem następuje wolniejsze wysycenie enzymu barwnikiem, co przekłada się na przewagę biokatalizy jako mechanizmu dekoloryzacji IC. W badaniach Daâssi i in. (2014) nad dekoloryzacją barwników anionowych i kationowych, przy użyciu lakazy z *Corioliopsis gallica* immobilizowanej na alginianie, również potwierdzono, że dla barwników należących do grupy barwników anionowych (RBBR i RB5) dominującym mechanizmem jest biokataliza (Daâssi i in. 2014). Wyniki badań przeprowadzonych przez Wang i in. (2017) wykazały, że na efektywność procesu biokatalizy indygo karminu przez lakazy ma wpływ przede wszystkim elastyczność konformacyjna w miejscu aktywnym lakazy (Wang i in. 2017).

Dodatek mediatorów reakcji wpływa na potencjał redoks lakazy i prowadzi do wyższej wydajności katalitycznej odbarwiania indygo karminu. Dane literaturowe wskazują, że efektywność odbarwiania IC zwiększyć można aż do 85% przez dodatek aldehydu syringowego jako mediatora reakcji. Należy zwrócić uwagę, że dodatek mediatora może jednak znacząco wpływać na wzrost kosztów procesu, co wynika zarówno z ceny mediatora, jak i braku możliwości jego koimmobilizowania. Ponadto mediatory bardzo często stanowią substancje wysoce toksyczne, co uniemożliwia ich zastosowanie w procesach opartych na bezpiecznej, zielonej biokatalizie (Wang i in. 2017).

W niniejszych badaniach, dzięki odpowiedniemu doborowi warunków prowadzenia procesu uzyskano równie wysoką skuteczność usunięcia barwnika (87,77%) na drodze biokatalizy przy wykorzystaniu lakazy jako immobilizowanego biokatalizatora, bez zastosowania dodatkowych mediatorów.

Skuteczność usuwania IC poprzez sorpcję wynosiła około 5-7%. Indygo karmin jest barwnikiem anionowym, a jego struktura zawiera dwie grupy $-SO^-$, które są elektrostatycznie ujemne (Hevira i in. 2020), z kolei obecność zdeprotonowanych grup karboksylowych w strukturze alginianu, które nadają mu ładunek ujemny, utrudniają jego interakcję z innymi ujemnie naładowanymi cząsteczkami (Tyagi i in. 2021). W związku z tym można wnioskować, że IC, jako barwnik anionowy, ma mniejsze powinowactwo do kapsułek alginianowych, w wyniku czego wzrasta możliwość enzymatycznej degradacji barwnika. Ponadto w badaniach prowadzonych przez Daâssi i in. (2014) nad odbarwianiem barwników kationowych i anionowych, takich jak barwnik antrachinonowy (RBBR), barwniki diazowe (RB-5 i BBR) oraz barwniki metalokompleksowe (LG), przy użyciu immobilizowanej lakazy na nośniku alginianowym, stwierdzono, że podczas odbarwiania anionowego barwnika RBBR biokataliza była głównym mechanizmem odbarwiania, podczas gdy sorpcja na kapsułkach alginianowych bez enzymu wynosiła tylko około 12% (Daâssi i in. 2014). **Uzyskane wyniki w ramach niniejszych badań wykazały, że usuwanie IC na drodze sorpcji stanowi tylko około 7%, jednakże proces sorpcji IC może być także istotny dla optymalizacji kosztów procesu odbarwiania ścieków z tego barwnika lub jako proces doczyszczania ścieków po procesie biokatalizy.** Warto dodać, że aktualnie prowadzone są również badania nad opracowaniem nowoczesnych materiałów odpadowych jako sorbentów do procesów usuwania barwników (Achieng i in. 2019, Bhowmik i in. 2021, Zein i in. 2022). Prowadzenie badań także w tym zakresie, jak również poszukiwanie metod łączących proces biokatalizy z procesami sorpcji dla najefektywniejszego usuwania barwników wydaje się również obiecujące.

Na rysunku poniżej (Rysunek 11) przedstawiono widma dla roztworu IC przed i po procesie dekoloryzacji.



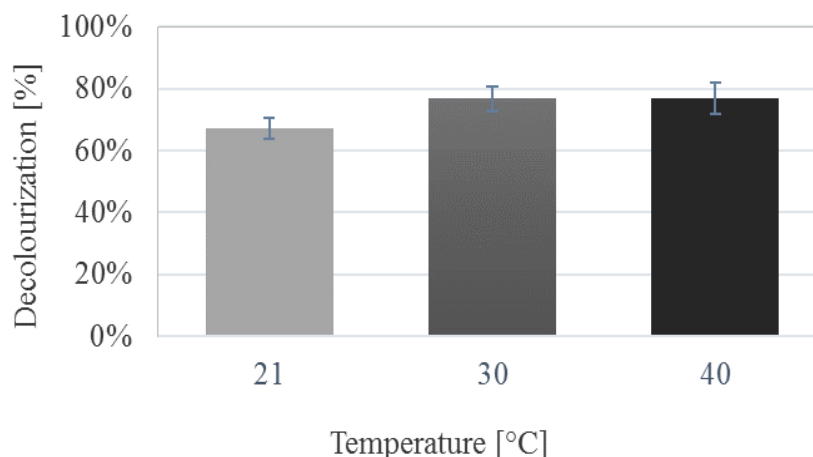
Rysunek 11 Widma absorpcyjne UV-VIS roztworu indygo karminu (IC) przed i po procesie dekoloryzacji, przy użyciu immobilizowanej lakazy (40 dni, temperatura: 21°C, dawka enzymu: 320 mg E/mg IC)

Źródło: Białowas i in. 2024a (**Publikacja 5**)

Na widmie UV-Vis dla roztworu barwnika przed procesem dekoloryzacji, widoczny jest pik przy 610 nm, który odpowiada za niebieski kolor indygo karminu. Pik ten nie jest widoczny w widmie dla roztworu barwnika po procesie dekoloryzacji z wykorzystaniem immobilizowanej lakazy. **Uzyskane wyniki badań wskazują, że nastąpiło rozszczepienie chromoforu indygo karminu.** Jak wskazują Holkar i in. (2016) rozszczepienie chromoforu jest kluczowym etapem degradacji barwnika, który sprawia, że fragmenty barwnika są bardziej podatne na dalszą biodegradację (Holkar i in. 2016). Centrum chromoforowe indygo karminu składa się z podwójnego wiązania C=C podstawionego przez dwie grupy donorowe NH i dwie grupy akceptorowe CO (Vautier i in. 2001). Uzyskane wyniki (Rysunek 11) wskazują na rozszczepienie grupy chromoforowej w cząsteczce barwnika i wytworzenie nowego związku. Widmo roztworu poddanego działaniu lakazy jest bardzo podobne do widma kwasu izatynosulfonowego (ISA) (Kandelbauer i in. 2008), który może powstawać z indygo karminu poprzez rozerwanie podwójnego wiązania w chromoforze. Analiza widma dla czystego indygo karminu przeprowadzona przez Wang i in. (2017) wykazała charakterystyczne piki dla długości

fali 610 nm, 287 nm i 250 nm w widmie absorpcji UV (Wang i in. 2017). Wyniki uzyskane w niniejszej pracy są zbieżne z wynikami uzyskanymi przez Wang i in. (2017). Na widmie dla czystego barwnika widoczne są piki przy długości fali 610 nm, 288 nm i 253 nm. Po procesie dekoloryzacji indygo karminu przy zastosowaniu dawki 320 mg E/1 mg IC, piki przy 610 nm i przy 288 nm zniknęły, a pasmo absorpcji przy 250 nm wzrosło i przesunęło się w stronę niebieskiego do 235 nm. Pojawienie się nowych pików widocznych na widmie dla próbki po procesie dekoloryzacji sugeruje pojawienie się produktów rozkładu barwnika, dlatego bardzo istotne jest monitorowanie czy podczas rozkładu nie powstaną nowe związki, które mogłyby być bardziej toksyczne od pierwotnego zanieczyszczenia podlegającego rozkładowi. **Na podstawie uzyskanych wyników rekomenduje się kontynuowanie badań obejmujących testy toksyczności próbek po procesie dekoloryzacji przy użyciu immobilizowanej lakazy na bazie alginianu sodu.**

Jednym z najważniejszych parametrów fizyko-chemicznych wpływających na aktywność enzymatyczną, a w konsekwencji na skuteczność odbarwiania, jest temperatura procesu. Liczne doniesienia literaturowe potwierdzają, że proces immobilizacji lakazy prowadzi do obniżenia wrażliwości enzymu na temperaturę. Wzrost stabilności termicznej jest kluczowym parametrem, który zwiększa możliwości zastosowania immobilizowanych enzymów w reakcjach katalitycznych (Olajuyigbe i in. 2019, Saoudi i Ghaouar 2019, Shokri i in. 2021). W niniejszych badaniach wpływ temperatury na skuteczność procesu odbarwiania IC testowano w 21°C, 30°C i 40°C przez 20 dni. Uzyskane wyniki wykazały, że optymalna temperatura dla procesu dekoloryzacji IC za pomocą lakazy immobilizowanej na alginianie sodu mieści się w zakresie 30-40°C (Rysunek 12). Proces dekoloryzacji IC w temperaturze 30 i 40°C umożliwił usunięcie około 77% barwnika.



Rysunek 12 Wpływ temperatury (21, 30 i 40°C) na skuteczność dekoloryzacji indygo karminu w czasie 20 dni, dawka enzymu: 320 mg/mg IC

Źródło: Białowās i in. 2024a (**Publikacja 5**)

Uzyskane wyniki są zgodne z wynikami badań przeprowadzonych przez Lassouane i in. (2019), którzy wykazali, że wolna i unieruchomiona lakaza charakteryzowała się największą stabilnością termiczną w temperaturze 30°C. Jednak w temperaturze 40°C i ponad 50°C unieruchomiona lakaza zachowała odpowiednio ponad 90% i 50% swojej początkowej aktywności. Natomiast stabilność wolnej lakazy znacznie spadła w temperaturze przekraczającej 30°C. Zwiększona stabilność termiczna immobilizowanej lakazy, w porównaniu z natywną formą tego enzymu, może wynikać z ochrony białka enzymatycznego przed wpływem temperatury dzięki otoczce alginianowej (Lassouane i in. 2019). Teerapatsakul i in. (2017) zademonstrowali wielokrotną dekoloryzację barwników syntetycznych w 5-litrowym bioreaktorze typu airlift. W procesie wykorzystano lakazę pochodzącą z *Ganoderma sp.* KU-Alk4 immobilizowaną na alginianie miedzi. Unieruchomiony enzym wykazywał wysoką skuteczność degradacji różnych barwników syntetycznych w warunkach niebuforowanych, w szczególności barwnika IC. Dodatkowo, immobilizowana lakaza wykazała znaczny wzrost stabilności w odniesieniu do temperatury i pH w porównaniu do wolnego enzymu. Optymalna temperatura dla aktywności wolnej, jak i immobilizowanej lakazy, wynosiła 37°C i nie zmieniła się po immobilizacji z użyciem alginianu miedzi. Immobilizacja spowodowała wzrost stabilności termicznej kapsułek enzymatycznych - zachowano początkową aktywność enzymatyczną preparatów w temperaturze aż do 55°C przez 1 godzinę (o 10°C więcej w porównaniu do wolnego enzymu), co jest korzystne dla praktycznego wdrożenia wykorzystania immobilizowanego enzymu. Co więcej,

immobilizowany enzym zachował 98% swojej początkowej aktywności po 1 h inkubacji w temperaturze do 65°C (Teerapatsakul i in. 2017).

Podsumowując, opisane w ramach **Publikacji 5** badania wykazały, że immobilizowana lakaza z *Trametes versicolor* na nośniku z alginianu sodu może stanowić potencjalnie użyteczne "zielone narzędzie" w procesie usuwania indygo karminu. Dopelnienie wiedzy stanowi przeprowadzona pogłębiona analiza parametrów geometrycznych opracowanych kapsulek enzymatycznych na bazie alginianu sodu, jak i kapsulek bez enzymu. Immobilizację lakazy potwierdzono za pomocą spektroskopii Ramana. Optymalną temperaturę dla procesu dekoloryzacji indygo karminu za pomocą lakazy immobilizowanej na alginianie sodu ustalono na 30-40°C. **Proces dekoloryzacji przy użyciu immobilizowanej lakazy z zastosowaniem dawki enzymu 320 mg E/mg IC umożliwił usunięcie IC na poziomie 92,5% w ciągu 40 dni, przy czym 87,77% stanowiło usunięcie IC na drodze biokatalizy, bez zastosowania dodatkowych mediatorów reakcji.** Wyniki niniejszych badań pozwalają wnioskować, iż **dominującym mechanizmem usuwania IC (barwnik anionowy) przy użyciu immobilizowanej lakazy jest biokataliza.** Analiza widm próbek roztworu barwnika przed i po procesie dekoloryzacji wskazuje na **rozszczenie grupy chromoforowej IC, co jest kluczowym etapem degradacji barwników**, bowiem kolejne produkty przemiany stają się bardziej podatne na dalszą biodegradację. Niemniej jednak istotne jest aby monitorować czy podczas rozkładu nie powstają związki pośrednie, które mogłyby być bardziej toksyczne od pierwotnego zanieczyszczenia podlegającego rozkładowi.

6.3 Analiza możliwości zastosowania biopolimerów o różnej lepkości jako nośników do immobilizacji lakazy w usuwaniu barwników syntetycznych (**Publikacja 6**)

Badania przeprowadzone w ramach **Publikacji 6** koncentrowały się na ocenie możliwości zastosowania biopolimerów o różnej lepkości (wysoka, średnia i niska lepkość) jako nośników do immobilizacji lakazy w celu usuwaniu barwników syntetycznych. **Większość dotychczasowych badań nad usuwaniem barwników, w szczególności z udziałem enzymów lub mikroorganizmów, koncentrowała się głównie na pojedynczych barwnikach.** Biorąc pod uwagę, że ścieki przemysłowe często zawierają mieszaniny barwników, nowością a także istotą niniejszej pracy jest ocena skuteczności dekoloryzacji zarówno pojedynczych barwników, jak i ich mieszaniny, przy użyciu lakazy immobilizowanej na alginianie sodu o różnej lepkości. Istotnym elementem pracy było także określenie dominującego mechanizmu dekoloryzacji indygo karminu (IC),

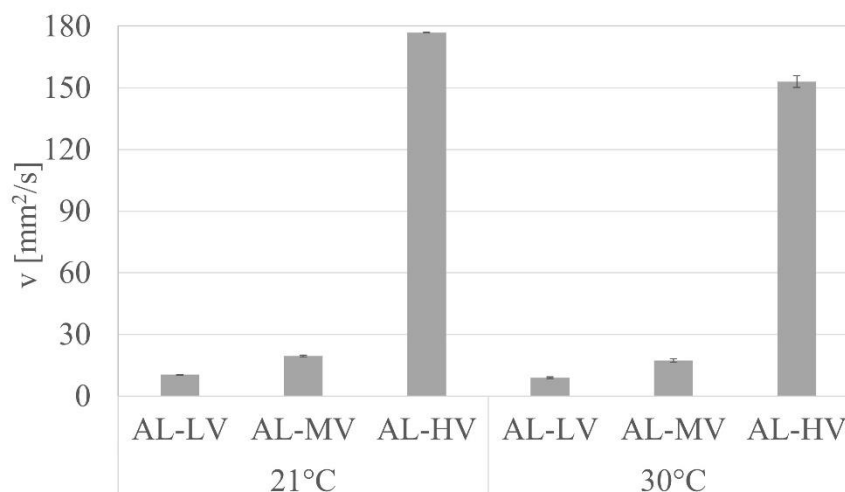
należącego do barwników anionowych oraz błękitu metylenowego (MB) – barwnika kationowego, jak i mieszaniny tychże barwników.

Spośród różnorodnych nośników, biopolimery, w szczególności alginiany, uznawane są jako jedne z najbardziej obiecujących materiałów do immobilizacji enzymów (Deska i Kończak 2020, Hurtado i in. 2022, Dalginli i Atakisi 2023, Thirumavalavan 2023). Alginiany posiadają szereg pożądanych właściwości, tj. są nietoksyczne, biodegradowalne, biokompatybilne i cechują się łatwą dostępnością, co czyni je cennymi w kontekście zastosowań w różnych gałęziach przemysłu, takich jak: biomedycyna, bioinżynieria, biotechnologia, farmaceutyka, przemysł papierniczy i opakowaniowy (Hurtado i in. 2022, Marszałek 2023), przede wszystkim ze względu na ich zdolność do tworzenia hydrożeli, kapsułek, włókien i folii. Struktura alginianów składa się z dwóch jednostek monomerycznych: kwasu β -(1,4)-D-mannuronowego (ManA lub M) oraz kwasu α -(1,4)-L-guluronowego (GulA lub G) połączonych wiązaniami glikozydowymi. Są one losowo rozmieszczone w liniowym łańcuchu i mogą być ułożone jako jednorodne bloki MM lub GG, jak również jako heterogeniczne bloki MG (Ching i in. 2017). Proces żelowania zachodzi poprzez wprowadzenie substancji sieciujących, zwykle jonów dwuwartościowych, takich jak np. jony wapnia, które oddziałują z regionami bogatymi w bloki GG. Proces sieciowania alginianu przebiega zgodnie z tak zwanym "modelem pudełka na jajka" (ang. „egg-box model”) (Ching i in. 2017, Hurtado i in. 2022). W alginianie ułożenie poszczególnych monomerów w łańcuchu, a także jego masa cząsteczkowa, jak i udział procentowy każdego monomeru, są czynnikami, które powodują znaczne różnice strukturalne i nadają im specyficzne właściwości fizykochemiczne. Zawartość, skład i stosunek M/G dla danego alginianu może różnić się nie tylko w zależności od gatunku i wieku alg, z których jest ekstrahowany, od lokalizacji, położenia geograficznego i pory roku, ale i w zależności od tkanki w obrębie tego samego gatunku. Ta zmienność przekłada się na właściwości funkcjonalne danego alginianu, w tym lepkość, rozpuszczalność, reakcje z jonami metali i właściwości żelowania (Silva i in. 2012, Ma i in. 2014, Fertah i in. 2017, Rhein-Knudsen i in. 2017, Abka-Khajouei i in. 2022). Zawartość kwasu guluronowego w żelach alginianowych determinuje ich kruchość i wytrzymałość, natomiast zawartość kwasu mannuronowego decyduje o elastyczności i mniejszej wytrzymałości powstałego żelu (Peteiro 2018, Łabowska i in. 2019, Abka-Khajouei i in. 2022, Hurtado i in. 2022). Lepkość roztworu przed żelowaniem, jak również sztywność i wytrzymałość po żelowaniu, mogą być w pewnym zakresie kontrolowane poprzez masę cząsteczkową alginianu. Masa cząsteczkowa alginianu zależy od metody ekstrakcji, np. możliwe jest jej zwiększenie poprzez ekstrakcję na zimno. Z kolei wyższe temperatury podczas ekstrakcji mogą prowadzić do rozpadu łańcuchów kwasu uronowego,

a w konsekwencji do obniżenia lepkości ekstrahowanego alginianu. Kontrolowanie lepkości alginianu jest zatem istotnym czynnikiem w kontekście przemysłowego zastosowania tego biopolimeru. Alginiany o niskiej lepkości są pożądane do zastosowań w przemyśle papierniczym i owocowym, podczas gdy alginiany o wysokiej lepkości są zwykle stosowane w przemyśle spożywczym i kosmetycznym. Zdolność do tworzenia lepkich roztworów i żeli w środowisku wodnym jest również ważna w przemyśle farmaceutycznym (Chee i in. 2011, Lee i Mooney 2012). Zwiększenie masy cząsteczkowej alginianów może poprawić właściwości fizyczne żeli, jednak zbyt duża masa cząsteczkowa alginianu może prowadzić do ekstremalnej lepkości. Komercyjne alginiany są dostępne jako sole sodowe, potasowe lub amonowe, o masie cząsteczkowej od 60 000 do 700 000 Daltonów, w zależności od planowanego zastosowania (Abka-Khajouei i in. 2022).

Podsumowując, stosunek bloków M/G w danym alginianie jest istotny dla uzyskania odpowiednich właściwości wytworzonego żelu. Zagadnienia te były obiektem zainteresowania naukowców z dziedziny biomedycyny i przemysłu rolniczego (Łabowska i in. 2019, Martínez-Cano i in. 2022). Równie interesujące wydaje się zbadanie tych zagadnień w kontekście wykorzystania alginianów jako matryc do immobilizacji enzymów. **Zatem nowością badań przeprowadzonych w ramach Publikacji 6, a zarazem głównym celem badawczym było dokonanie oceny możliwości zastosowania alginianów o różnej lepkości jako nośników do immobilizacji lakazy do zastosowania w dekoloryzacji barwników.**

Pierwszy etap badań miał na celu określenie lepkości roztworów badanych alginianów o stężeniu 2% (w/o), w temperaturze 21°C i 30°C (wybór temperatury dla pomiarów lepkości wynikał z warunków przygotowywania kapsulek alginianowych (21°C) oraz temperatury prowadzenia procesu dekoloryzacji (30°C)). Spośród testowanych alginianów, AL-HV posiadał najwyższą lepkość, określoną przez współczynnik lepkości kinematycznej (ν), wynoszący 176,93 mm²/s i 153,01 mm²/s, odpowiednio w temperaturze 21°C i 30°C. Natomiast najniższą lepkością charakteryzował się alginian AL-LV, blisko dwukrotnie niższą niż AL-MV i 17-krotnie niższą niż AL-HV (Rysunek 13).



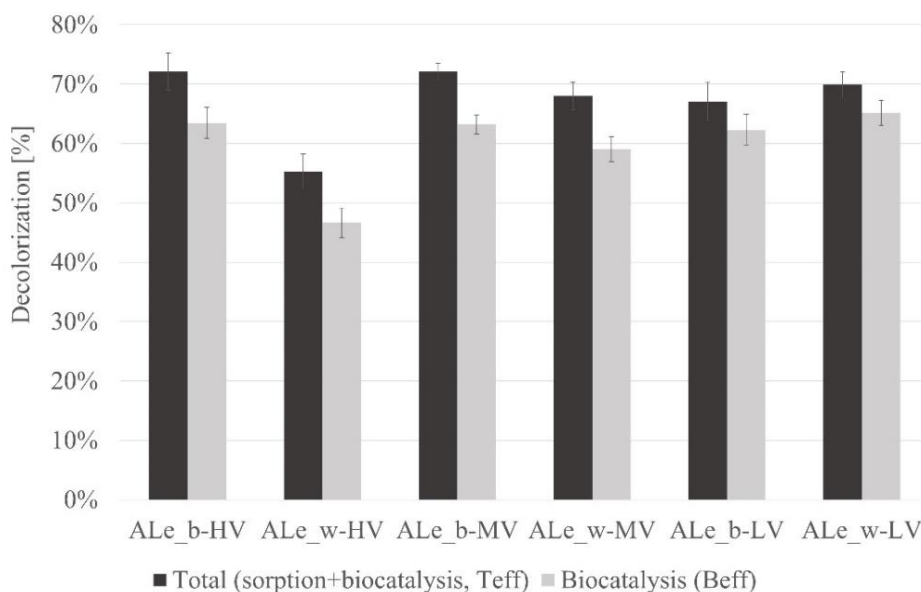
Rysunek 13 Lepkość badanych roztworów alginianu sodu (2%) w temperaturze 21°C i 30°C

Źródło: Białowas i in. 2024b (**Publikacja 6**)

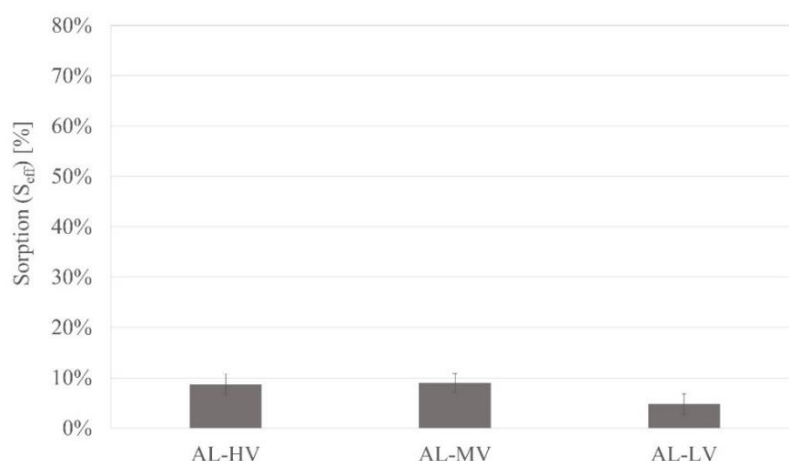
Lepkość roztworu alginianu w dużym stopniu zależy od temperatury, konformacji molekularnej polimeru i siły jonowej rozpuszczalnika. Roztwory alginianu wykazują niższą lepkość w wysokich temperaturach i przy wyższej sile jonowej, co przypisuje się zwiększeniu odległości międzycząsteczkowych w wyniku rozszerzalności cieplnej (Ma i in. 2014, Abkakhajouei i in. 2022), co jest zgodne z wynikami uzyskanymi w niniejszych badaniach.

Kolejny etap stanowiły **badania skuteczności dekoloryzacji zarówno pojedynczych barwników, jak i ich mieszaniny, przy użyciu lakazy immobilizowanej na alginianie sodu o różnej lepkości**. Dekoloryzacji poddano następujące barwniki: indygo karmin w stężeniu 5 mg/L (barwnik anionowy), błękit metylenowy w stężeniu 5 mg/L (barwnik kationowy), jak i ich mieszaninę w stosunku molowym MB/IC=0,69. **Istotnym elementem badań była także identyfikacja dominującego mechanizmu dekoloryzacji dla roztworów pojedynczych barwników, jak i dla ich mieszaniny**. W tym celu eksperymenty dekoloryzacji przeprowadzono jednocześnie przy użyciu kapsułek alginianowych z enzymem (enzymatyczne kapsułki alginianowe na bazie alginianu o wysokiej lepkości ALe-HV, średniej lepkości ALe-MV i niskiej lepkości ALe-LV), jak i kapsułek bez enzymu (odpowiednio AL-HV, AL-MV, AL-LV). Ponadto testowane kapsułki enzymatyczne zawierały enzym rozpuszczony w wodzie (w) lub buforze (b). **Na podstawie uzyskanych wyników badań stwierdzono, że przy użyciu kapsułek enzymatycznych przygotowanych na bazie trzech analizowanych alginianów, głównym mechanizmem usuwania barwnika IC była biokataliza** (Rysunek 14a).

a)



b)



Rysunek 14 Dekoloryzacja indygo karminu: a) odbarwienie przy użyciu alginianowych kapsułek enzymatycznych, b) sorpcja na kapsułkach alginianowych

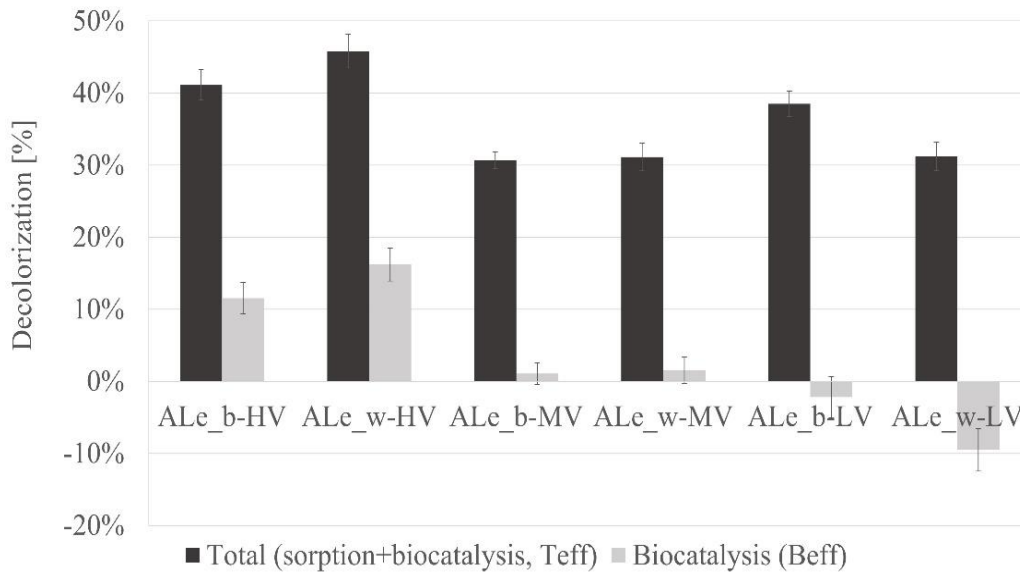
Źródło: Białowas i in. 2024b (**Publikacja 6**)

Zastosowanie kapsułek enzymatycznych z immobilizowaną lakazą na alginianach o różnej lepkości umożliwiło usunięcie barwnika IC w zakresie od 55,31% (ALe_w-HV) do 72,15% (ALe_b-MV) w ciągu 10 dni. Skuteczność usuwania IC na drodze biokatalizy (B_{eff}) wyniosła 46,64% dla ALe_w-HV i 65,15% dla ALe_w-LV. Niezależnie od użytego alginianu, usunięcie IC nastąpiło głównie na drodze biokatalizy. Sorpcja IC na kapsułkach bez enzymu wyniosła około 5% i 9%, odpowiednio dla kapsułek przygotowanych na nośniku AL-LV oraz dla alginianów cechujących się wyższą lepkością - AL-MV i AL-HV (Rysunek 14b). Przewaga

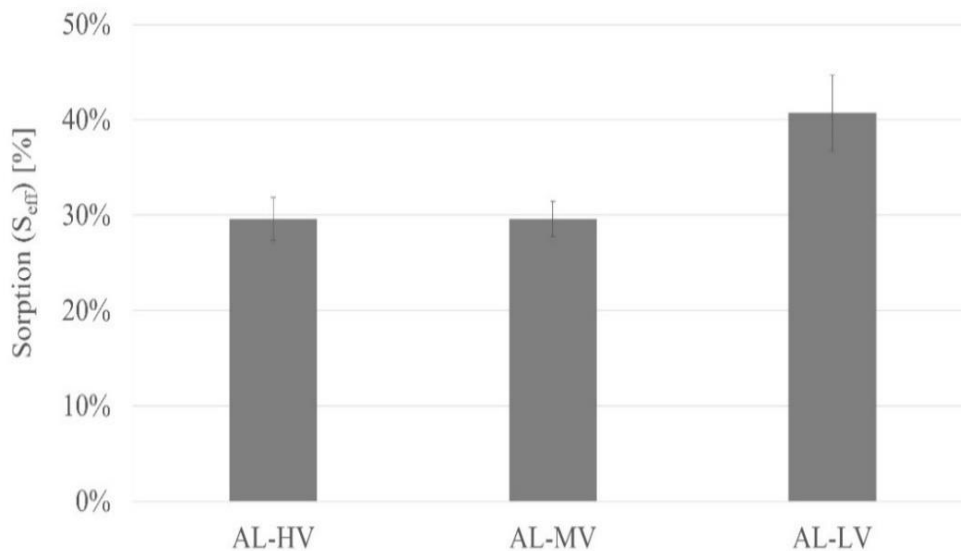
biokatalizy nad sorpcją w dekoloryzacji IC przy użyciu enzymatycznych kapsułek może wynikać z budowy tego barwnika, który jest klasyfikowany jako barwnik anionowy. Mniejsze powinowactwo IC do alginianu wynika najprawdopodobniej z ujemnie naładowanej powierzchni alginianu (Tyagi i in. 2021), zwiększając tym samym prawdopodobieństwo enzymatycznego usunięcia barwnika, co potwierdzają uzyskane wyniki. Skuteczność metod biologicznych w usuwaniu IC została także potwierdzona w badaniach prowadzonych przez Ahlawat i in. (2022). Wykazali oni degradację IC do kwasu antranilowego przez oksydoreduktazy, w szczególności lakazę, obecną w pożywce hodowlanej grzyba wyhodowanego na otrębach pszennych i skórkach pomarańczy. Zostało to dodatkowo potwierdzone przez traktowanie IC oczyszczoną lakazą. Ponadto jako jeden z produktów degradacji zidentyfikowano kwas izatynosulfonowy, który może powstawać w wyniku rozerwania podwójnego wiązania w chromoforze IC (Wang i in. 2017, Ahlawat i in. 2022), co pozostaje w zgodzie z wynikami badań przedstawionymi w **Publikacji 5**.

Proces dekoloryzacji MB przy użyciu kapsułek enzymatycznych z immobilizowaną lakazą na bazie alginianów o różnej lepkości przebiegał z całkowitą skutecznością usuwania barwnika (T_{eff}) w zakresie od 30,68% (ALe_b-MV) do 45,80% (ALe_w-HV) (Rysunek 15a). **Niezależnie od zastosowanego alginianu, proces sorpcji przeważał nad biokatalizą** (Rysunek 15b). W przypadku kapsułek enzymatycznych na bazie alginianu o wysokiej lepkości (ALe-HV), całkowita skuteczność usuwania MB wynosiła 45,80% i była najwyższą spośród badanych alginianów, a udział biokatalizy w całkowitym usunięciu barwnika również był najwyższy (11,5% i 16,2%) spośród badanych alginianów. **W przypadku dekoloryzacji MB zaobserwowano zależność, że im niższa lepkość alginianu, tym w procesie dekoloryzacji przeważał proces sorpcji nad biokatalizą, przy czym dla alginianu o najniższej lepkości dekoloryzacja nastąpiła wyłącznie na drodze sorpcji.** W dekoloryzacji MB, wartość współczynnika sorpcji (SC) wzrasta wraz ze zmniejszeniem lepkości alginianu, osiągając wartość 1 dla alginianu o najniższej lepkości, co oznacza, że proces odbarwienia zachodził wyłącznie poprzez sorpcję. Warto również zaznaczyć, iż w tym przypadku sorpcja na kapsułkach bez enzymu była wyższa niż na kapsułkach enzymatycznych. Kapsułki bez enzymu usunęły ponad 40% barwnika na drodze sorpcji, podczas gdy kapsułki enzymatyczne usunęły 31,18% do 38,48% MB. Było to najprawdopodobniej spowodowane mniejszą powierzchnią sorpcyjną kapsułek z immobilizowanym enzymem.

a)



b)



Rysunek 15 Dekoloryzacja błękitu metylenowego: a) odbarwianie przy użyciu alginianowych kapsułek enzymatycznych, b) sorpcja na kapsułkach alginianowych

Źródło: Białowas i in. 2024b (**Publikacja 6**)

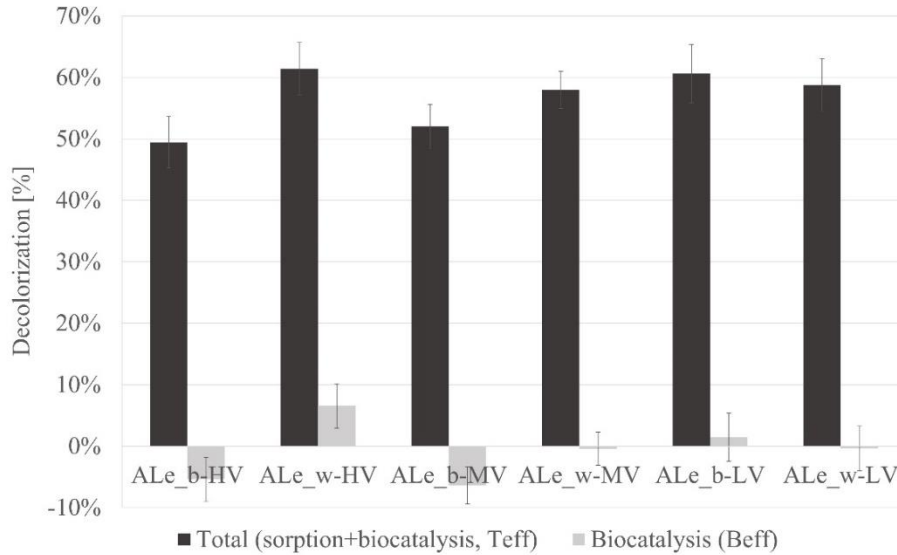
Wyższa skuteczność sorpcji na kapsułkach alginianowych w dekoloryzacji MB w porównaniu do IC może być podyktowana większym powinowactwem MB do alginianu wynikającym z jonizacji tego barwnika – należy on do barwników kationowych, podczas gdy IC jest barwnikiem anionowym. **Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że lepkość badanych alginianów wpływa na skuteczność enzymatycznej degradacji MB, bowiem najwyższą całkowitą skuteczność usuwania MB uzyskano przy użyciu kapsułek enzymatycznych na bazie alginianu o najwyższej lepkości, a dekoloryzacja nastąpiła na**

drodze obu mechanizmów - biokatalizy i sorpcji. Wyniki badań przeprowadzonych przez Daâssi et al. (2014) również wskazują na wysoki udział sorpcji w dekoloryzacji kationowego barwnika Bismark Brown R (BBR) przy użyciu kapsułek Ca-alginianowych z immobilizowaną lakazą wyekstrahowaną z *Corioloopsis gallica*. Warto również zauważyć, że dodanie mediatora redoks, 1-hydroksybenzotriazolu (HBT), nie skutkowało wzrostem usunięcia tego barwnika (Daâssi i in. 2014). Ponadto badania przeprowadzone przez Enayatzamir i in. (2010) wykazały, że kationowy barwnik BBR był odporny na biodegradację przez grzyba *Phanerochaete chrysosporium* immobilizowanego na alginianie, a usunięcie barwnika nastąpiło głównie na drodze sorpcji przez kapsułki alginianowe (Enayatzamir i in. 2010). Interesującym kierunkiem badań jest także wykorzystanie związków odpadowych np. kwasów humusowych, pozyskiwanych z osadów ściekowych powstających w procesach oczyszczania ścieków, jako sorbentów do usuwania barwników kationowych (Michalska i in. 2022, Zhang i in. 2020). Wielu badaczy wykazało, że odbarwianie MB zachodzi głównie poprzez sorpcję, co może wskazywać, że dla tego rodzaju barwników metoda sorpcji może stanowić najbardziej obiecującą metodę usuwania (Hamad i Idrus 2022, Radoor i in. 2022, Shah i in. 2022). Jednak wyniki uzyskane w ramach niniejszych badań wskazują, że możliwe jest usunięcie MB na drodze biokatalizy, pod warunkiem zastosowania alginianu o wyższej lepkości. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi, zarówno degradacja enzymatyczna, jak i odbarwianie przez sorpcję są skuteczne w usuwaniu różnych barwników, dlatego obiecujące może być także połączenie tych metod w jedną metodę hybrydową i dlatego należy rozważyć te kwestie w opracowywaniu nowych technologii do zastosowań przemysłowych (Katheresan i in. 2018).

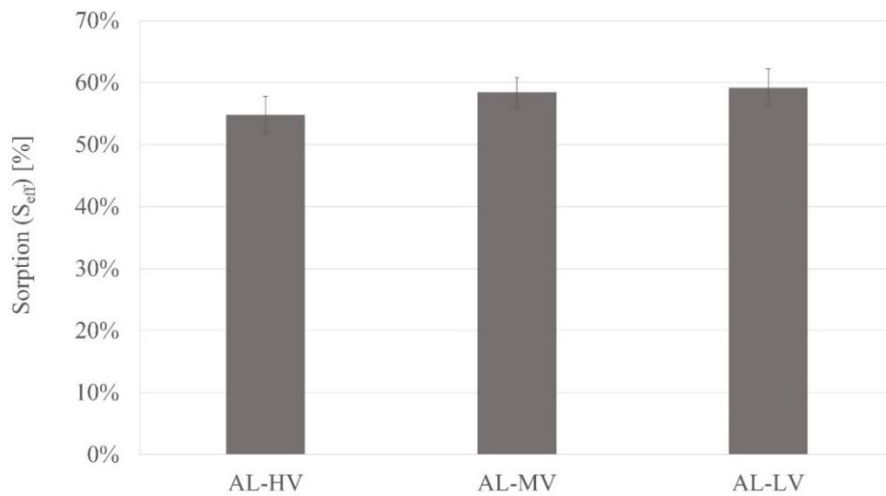
Przeprowadzono także eksperyment dekoloryzacji poszczególnych barwników (IC i MB) z ich mieszaniny (M). **Całkowita skuteczność usuwania IC oraz MB z mieszaniny różniła się w stosunku do wartości uzyskanych w procesie dekoloryzacji dla pojedynczych barwników. Jest to szczególnie widoczne w przypadku usuwania IC z mieszaniny**, gdzie skuteczność usuwania na drodze biokatalizy (B_{eff}) stanowiła blisko 7% w przypadku ALe_w-HV i 1,44% dla ALe_b-LV. Całkowita skuteczność usuwania (T_{eff}) IC przy użyciu kapsułek enzymatycznych: ALe_b-HV, ALe_b-MV, ALe_w-MV, ALe_w-LV była niższa w stosunku do skuteczności usuwania na drodze sorpcji (S_{eff}) przy użyciu kapsułek bez enzymu (Rysunek 16 a). Całkowita skuteczność usuwania IC z mieszaniny była niższa i wynosiła około 50 do 61%, podczas gdy odbarwienie roztworu pojedynczego barwnika IC wynosiło około 70%. Ponadto usunięcie IC z mieszaniny nastąpiło głównie na drodze sorpcji na kapsułkach niezależnie od użytego alginianu (Rysunek 16 b). Tylko w przypadku kapsułek ALe_w-HV

i ALe_b-LV, nastąpiło usunięcie barwnika również na drodze biokatalizy i wynosiło odpowiednio 6,56% przy T_{eff} 61,38% i 1,44% przy T_{eff} 60,61%.

a)



b)

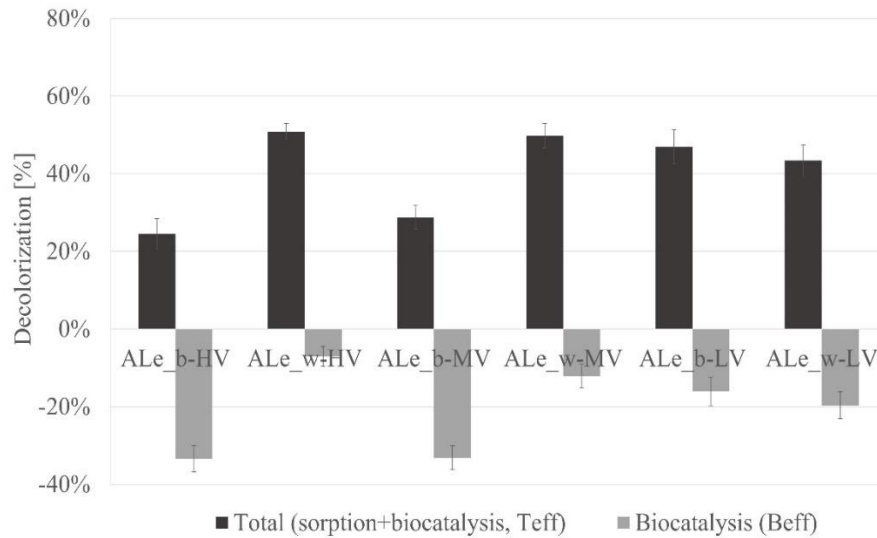


Rysunek 16 Dekoloryzacja indygo karminu w mieszaninie a) odbarwienie przy użyciu alginianowych kapsułek enzymatycznych, b) sorpcja na kapsułkach alginianowych

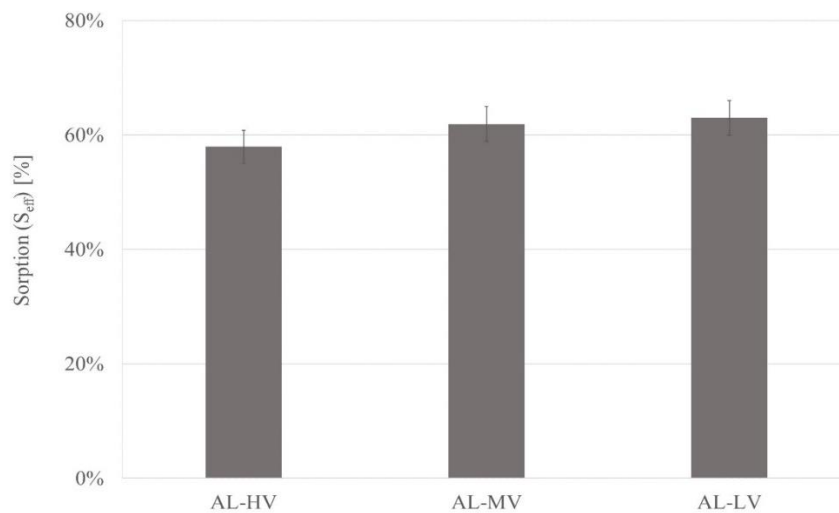
Źródło: Białowas i in. 2024b (**Publikacja 6**)

Dekoloryzacja MB w mieszaninie nastąpiła wyłącznie na drodze sorpcji. Należy zauważyć, że w przypadku usuwania MB z mieszaniny, skuteczność sorpcji (S_{eff}) przy użyciu kapsułek bez enzymu była wyższa w stosunku do całkowitej skuteczności usunięcia barwnika przy użyciu kapsułek z enzymem (Rysunek 17a, b).

a)



b)



Rysunek 17 Dekoloryzacja błękitu metylenowego w mieszaninie a) odbarwianie przy użyciu alginianowych kapsułek enzymatycznych, b) sorpcja na kapsułkach alginianowych

Źródło: Białowas i in. 2024b (**Publikacja 6**)

Wynika to najprawdopodobniej z ograniczonej powierzchni sorpcyjnej kapsułek wypełnionych enzymem. Ponadto na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, iż **mechanizm usuwania barwników w mieszaninie jest odmienny niż podczas odbarwiania roztworów pojedynczych barwników**. Trudności w usuwaniu barwników z ich mieszanin mogą wynikać z różnorodnych reakcji, które mogą zachodzić między barwnikami w roztworze. Różnice w strukturze przestrzennej lub potencjale redoks mogą mieć znaczący wpływ na efektywność odbarwiania (Park i in. 2007).

Jednym z największych wyzwań stojących obecnie przed przemysłem jest przejście na bardziej ekologiczne i bardziej przyjazne dla środowiska procesy. Wszystkie innowacje mają na celu m.in. zminimalizowanie lub całkowite wyeliminowanie powstawania zanieczyszczeń i minimalizację wykorzystania toksycznych i niebezpiecznych surowców (Castillo - Suárez i in. 2023). W związku z tym, aby wyeliminować ryzyko powstawania podczas procesu związków, które mogą być bardziej toksyczne niż same usuwane zanieczyszczenia, **w ramach niniejszych badań przeprowadzono ocenę toksyczności roztworów barwników i ich mieszaniny, jak i roztworów po procesie dekoloryzacji.** Wyniki testów toksyczności uzyskane dla roztworów wzorcowych wykazały wzrost toksyczności wraz ze wzrostem stężenia dla barwnika MB. W przypadku mieszaniny M, niskie stężenia powodowały efekt stymulacji luminescencji, z kolei w przypadku roztworu IC w zakresie analizowanych stężeń zaobserwowano stymulację luminescencji. Stymulacja luminescencji może wynikać z efektu hormezy (Drzymała i Kalka 2020). Także Ahlawat i in. (2022) w swoich badaniach nad biologicznymi metodami usuwania IC wykazali, że barwnik ten był degradowany przez lakazę z *Cyathus bulleri* do kwasu antranilowego, a dodanie IC do pożywki hodowlanej tego grzyba spowodowało stymulację jego wzrostu. Ponadto obniżenie toksyczności IC po dekoloryzacji przy użyciu filtratów uzyskanych z grzyba *Cyathus bulleri* potwierdzono za pomocą testu Ames z użyciem *Salmonella typhimurium* TA98 (Ahlawat i in. 2022). Stymulację luminescencji powodować mogą także inne obecne w ściekach substancje, a zwłaszcza związki organiczne. Z tego powodu należy skrupulatnie analizować uzyskane wyniki z testów toksyczności.

W analizowanych próbach roztworu barwnika IC przed, jak i po procesie dekoloryzacji obserwowano stymulację bioluminescencji. Podczas dekoloryzacji MB przy użyciu kapsulek enzymatycznych na bazie alginianu o wysokiej lepkości usunięcie barwnika zachodziło zarówno na drodze sorpcji, jak i biokatalizy, co okazało się korzystne, skutkując najwyższą skutecznością odbarwienia, a także redukcją inhibicji luminescencji w stosunku do kontrolnego roztworu barwnika. Badania przeprowadzone przez Ezike i in. (2020) mające na celu usunięcie m.in. barwnika MB przy użyciu lakazy z *Trametes polyzona* WRF03 wykazały, że enzym ten nie był skuteczny w odbarwianiu zarówno MB, jak i barwnika tiazynowego (Azure B) (Ezike i in. 2020). Podobnie, nie zaobserwowano odbarwienia MB przez lakazę z *Perenniporia tephropora* nawet w obecności mediatora - 1-hydroksybenzotriazolu (HBT) (Younes i in. 2007). Odmienne wyniki uzyskali Wu i in. (2022). Wykazali oni, że wyizolowany szczep bakterii *Bacillus thuringiensis* był skuteczny w odbarwianiu MB, co mogło wynikać z synergicznego działania enzymów takich jak: lakazy, peroksydazy manganowe, peroksydazy

ligninowe i reduktazy NADH-DCIP. Ponadto badania fitotoksyczności wykazały również, że MB został zdegradowany do metabolitów o niższej toksyczności (Wu i in. 2022).

Wyniki testów toksyczności uzyskane w niniejszych badaniach wskazują na różne mechanizmy usuwania barwników z ich mieszaniny. W eksperymencie, gdzie zastosowano kapsułki z enzymem ALe_b-HV, zaobserwowano wzrost toksyczności roztworów po dekoloryzacji. Co ciekawe, również zastosowanie kapsułek ALe_b-HV skutkowało najniższą całkowitą skutecznością usuwania IC i MB z mieszaniny tych barwników. Biodegradacja IC mogła skutkować zwiększeniem toksycznego działania MB, zwłaszcza w przypadku kapsułek AL-HV o niższym powinowactwie do MB, co potwierdzają uzyskane wyniki testów. Mając na uwadze złożoność procesów dekoloryzacji mieszanin barwników istotne jest prowadzenie badań toksyczności próbek po procesie dekoloryzacji, w celu monitorowania ryzyka powstawania bardziej toksycznych metabolitów pośrednich niż pierwotne zanieczyszczenia podlegające rozkładowi.

Przeprowadzone w ramach **Publikacji 6** badania wykazały, że możliwe jest usunięcie barwników MB i IC oraz ich mieszaniny przy użyciu immobilizowanej lakazy na alginianie sodu o różnej lepkości, jednak proces ten zachodzi na drodze odmiennych mechanizmów i z różną skutecznością. Na **główny mechanizm dekoloryzacji ma także wpływ rodzaj barwnika (kationowy, anionowy). Niezależnie od użytego alginianu, usunięcie IC (max. całkowita skuteczność usuwania 72,15%) nastąpiło głównie na drodze biokatalizy, co potwierdziły również wyniki uzyskane w Publikacji 5. Dekoloryzacja MB następowała głównie poprzez sorpcję przez kapsułki alginianowe, a skuteczność usuwania na drodze biokatalizy była niska. Jednak najwyższą całkowitą skuteczność dekoloryzacji MB (45,80%) uzyskano przy użyciu kapsułek na bazie alginianu o wysokiej lepkości, gdzie dekoloryzacja zachodziła zarówno na drodze biokatalizy, jak i sorpcji. Ponadto występowanie zarówno biokatalizy, jak i sorpcji podczas dekoloryzacji MB sprzyjało redukcji toksyczności próbek poprocesowych.** Wyniki testów dekoloryzacji MB wskazały, że im niższa lepkość alginianu, tym w procesie dekoloryzacji bardziej przeważał proces sorpcji nad biokatalizą, przy czym zastosowanie kapsułek na bazie alginianu o najniższej lepkości skutkowało dekoloryzacją MB wyłącznie na drodze sorpcji. Usunięcie indygo karminu z mieszaniny nastąpiło głównie na drodze sorpcji na kapsułkach, niezależnie od lepkości użytego alginianu, przy czym zastosowanie kapsułek na bazie alginianu o wysokiej lepkości (Ale_w-HV) umożliwiło usunięcie tego barwnika z mieszaniny również na drodze biokatalizy, przy jednoczesnej najwyższej całkowitej skuteczności usuwania w porównaniu do kapsułek na bazie alginianów o średniej i niskiej lepkości. Dekoloryzacja MB w mieszaninie nastąpiła

wyłącznie na drodze sorpcji, niezależnie od lepkości użytego alginianu. **Wyniki testów odbarwiania mieszaniny różnią się od wyników uzyskanych dla pojedynczych barwników, co wskazuje na odmienne mechanizmy usuwania barwników z ich mieszaniny.**

7 PERSPEKTYWY DALSZYCH BADAŃ

Przeprowadzone badania w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej stały się przyczynkiem do nakreślenia perspektyw dalszych badań w obszarze rozwoju technologii immobilizowanych enzymów do usuwania barwników ze ścieków. Wyszczególniono 4 obszary: enzym, nośnik do immobilizacji, proces dekoloryzacji oraz wydajność procesu w kolejnych cyklach dekoloryzacji, a wśród każdego obszaru wskazano kierunek badań (Tabela 4).

Tabela 4 Perspektywy dalszych badań w obszarze rozwoju technologii immobilizowanych enzymów do usuwania barwników ze ścieków

PERPEKTYWY DALSZYCH BADAŃ			
ENZYM	NOŚNIK DO IMMOBILIZACJI	PROCES DEKOLORYZACJI	WYDAJNOŚĆ PROCESU W KOLEJNYCH CYKLACH
Koimmobilizacja różnych enzymów o potencjalnych zdolnościach do rozkładu barwników-preparaty "multienzymatyczne".	Opracowanie nowoczesnych „kombinowanych” nośników na bazie 2 lub większej liczbie biopolimerów o odmiennych właściwościach fizyko-chemicznych np. fuzja polimerów alginianowych o różnej lepkości.	Zastosowanie dwustopniowego/ kombinowanego procesu oczyszczania ścieków zawierających mieszaniny barwników, opartego zarówno o proces biokatalizy, jak i sorpcji z wykorzystaniem odpowiednich nośników, promujących dany mechanizm.	Badania w zakresie wydajności dekoloryzacji przy użyciu kapsułek enzymatycznych w kolejnych cyklach dekoloryzacji.

Źródło: Opracowanie własne

8 PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowano następujące wnioski:

- 1. Możliwe jest opracowanie preparatów z immobilizowaną lakazą przy użyciu alginianu sodu jako nośnika, do usuwania barwników.** W ramach przeprowadzonych badań opracowano kapsułki alginianowe z immobilizowaną lakazą o kulistym kształcie i powtarzalnych parametrach geometrycznych. Dokonano wyboru metody immobilizacji, nośnika biopolimerowego i jego stężenia, stężenia i dawki enzymu w przeliczeniu na 1 mg barwnika. Immobilizację lakazy na nośniku alginianowym potwierdzono za pomocą spektroskopii Ramana. Skuteczność opracowanych preparatów enzymatycznych została także potwierdzona w dekoloryzacji barwników z zastosowaniem dawki enzymu 320 mg E/1 mg barwnika, co umożliwiło usunięcie barwników w zakresie od 45,8% do 92,5% w zależności od usuwanego barwnika i czasu trwania procesu dekoloryzacji.

Tym samym uzyskałam odpowiedź na zdefiniowane pytanie badawcze:

Czy możliwe jest opracowanie preparatów z immobilizowaną lakazą przy użyciu alginianu sodu jako nośnika?

- 2. Możliwe jest uzyskanie kapsulek enzymatycznych o powtarzalnych parametrach geometrycznych. Dokonałam pełnej charakterystyki parametrów geometrycznych kapsulek z immobilizowaną lakazą, jak i kapsulek bez enzymu.** Bezpośrednio po przygotowaniu, średnia długość kapsulek enzymatycznych wynosiła około 2,1 mm, a kapsulek bez enzymu około 2,4 mm, przy kolistości $C=0,99$. 5-dniowe suszenie kapsulek skutkowało zmniejszeniem długości o około 60%, jak i szerokości o około 70%, jednocześnie przy zachowaniu kształtu zbliżonego do kulistego ($C=0,90$ dla kapsulek z enzymem; $C=0,93$ dla kapsulek bez enzymu).

Tym samym uzyskałam odpowiedź na zdefiniowane pytanie badawcze:

Czy możliwe jest uzyskanie kapsulek enzymatycznych o powtarzalnych parametrach geometrycznych oraz w jaki sposób suszenie wpływa na ich parametry geometryczne?

- 3. Lakaza, zarówno w formie immobilizowanej, jak i natywnej wykazała najwyższą aktywność w pH 3.** Wzrost pH do 5 skutkował niewielkim spadkiem aktywności lakazy immobilizowanej w porównaniu do lakazy wolnej. W pH 7 wolna lakaza utraciła 98% aktywność. Z kolei immobilizowany enzym wewnątrz kapsułki alginianowej wykazał aktywność utleniając ABTS, o czym świadczyła zielona barwa wnętrza kapsułki. Zatem

otoczka alginianowa stanowi swego rodzaju barierę ochronną dla immobilizowanego enzymu, chroniąc go przed negatywnym działaniem wysokiego pH, tworząc wewnątrz kapsułki stabilne mikrośrodowisko dla działania enzymu.

Tym samym uzyskałam odpowiedź na zdefiniowane pytanie badawcze:

Jak wpływa pH na aktywność wolnych i immobilizowanych lakaz przy użyciu alginianu sodu?

4. Optymalna temperatura procesu dekoloryzacji za pomocą lakazy immobilizowanej na bazie alginianu sodu mieści się w zakresie 30-40°C.

Tym samym uzyskałam odpowiedź na zdefiniowane pytanie badawcze:

Jaka jest optymalna temperatura dla prowadzenia procesu dekoloryzacji przy użyciu opracowanych preparatów enzymatycznych na bazie alginianu sodu?

5. Możliwe jest usunięcie barwników błękitu metylenowego i indygo karminu oraz ich mieszaniny przy użyciu immobilizowanej lakazy na alginianie sodu o różnej lepkości, jednak proces ten zachodzi na drodze odmiennych mechanizmów i z różną skutecznością (całkowita skuteczność usuwania indygo karminu wynosiła 72,15%, a błękitu metylenowego 45,8%, indygo karminu w mieszaninie 61,38%, z kolei błękitu metylenowego w mieszaninie 50,85%).

Tym samym uzyskałam odpowiedź na zdefiniowane pytanie badawcze:

Czy możliwe jest usunięcie barwników błękitu metylenowego i indygo karminu oraz ich mieszaniny przy użyciu immobilizowanej lakazy na alginianie sodu?

6. **Proces dekoloryzacji barwników indygo karminu, błękitu metylenowego i ich mieszaniny przy użyciu kapsulek alginianowych zachodzi poprzez różne mechanizmy - sorpcję i/lub biokatalizę.**

Dominującym mechanizmem w usuwaniu indygo karminu (barwnika anionowego) jest biokataliza. Jednakże niewielki udział sorpcji w całkowitej dekoloryzacji IC może być także istotny dla optymalizacji procesu odbarwiania ścieków z tego barwnika lub jako proces doczyszczania ścieków po procesie biokatalizy.

Dekoloryzacja błękitu metylenowego (barwnik kationowy) zachodzi głównie poprzez sorpcję przez kapsułki alginianowe. Możliwe jest usunięcie błękitu metylenowego na drodze biokatalizy, pod warunkiem zastosowania alginianu o wyższej lepkości. Mechanizm usuwania barwników w mieszaninie jest odmienny w stosunku do odbarwiania roztworów pojedynczych barwników. Ponadto całkowita skuteczność usuwania indygo karminu oraz błękitu metylenowego z ich mieszaniny różniła się w stosunku do wartości uzyskanych w procesie dekoloryzacji dla pojedynczych

barwników. Całkowita skuteczność usuwania indygo karminu z mieszaniny była niższa, a usunięcie tego barwnika z mieszaniny nastąpiło głównie na drodze sorpcji przez kapsułki niezależnie od użytego alginianu. Dekoloryzacja błękitu metylenowego w mieszaninie nastąpiła wyłącznie na drodze sorpcji.

Tym samym uzyskałam odpowiedź na zdefiniowane pytanie badawcze:

Jakie mechanizmy dominują w usuwaniu barwników kationowych i anionowych na przykładzie błękitu metylenowego i indygo karminu, jak i ich mieszaniny, przy użyciu kapsulek alginianowych z immobilizowaną lakazą?

- 7. Niezależnie od lepkości alginianu, dekoloryzacja indygo karminu zachodziła głównie na drodze biokatalizy. Podczas dekoloryzacji błękitu metylenowego dominował proces sorpcji.** W przypadku dekoloryzacji błękitu metylenowego zaobserwowano zależność, że im niższa lepkość alginianu, tym w procesie dekoloryzacji bardziej przeważał proces sorpcji nad biokatalizą. Najwyższą całkowitą skuteczność dekoloryzacji błękitu metylenowego uzyskano przy użyciu kapsulek na bazie alginianu o wysokiej lepkości, gdzie dekoloryzacja zachodziła zarówno na drodze biokatalizy jak i sorpcji, co jednocześnie sprzyjało redukcji toksyczności próbek poprocesowych. **W usuwaniu błękitu metylenowego wyższa lepkość alginianu promuje usunięcie na drodze biokatalizy. Usunięcie indygo karminu z mieszaniny nastąpiło głównie na drodze sorpcji na kapsułkach,** niezależnie od lepkości użytego alginianu, **przy czym zastosowanie kapsulek na bazie alginianu o wysokiej lepkości umożliwiło usunięcie tego barwnika z mieszaniny również na drodze biokatalizy, przy jednoczesnej najwyższej całkowitej skuteczności usuwania** w porównaniu do kapsulek na bazie alginianów o średniej i niskiej lepkości. **Dekoloryzacja błękitu metylenowego w mieszaninie nastąpiła wyłącznie na drodze sorpcji,** niezależnie od lepkości użytego alginianu. Uzyskane wyniki różnicują skuteczność procesu dekoloryzacji, jak i dominujące mechanizmy, przy użyciu enzymów immobilizowanych na nośnikach o różnej lepkości w zależności od rodzaju barwnika poddanego dekoloryzacji.

Tym samym uzyskałam odpowiedź na zdefiniowane pytanie badawcze:

Czy lepkość badanych alginianów wpływa na proces dekoloryzacji barwników indygo karminu, błękitu metylenowego i ich mieszaniny?

- 8.** Wyniki testów toksyczności uzyskane dla roztworów wzorcowych wykazały wzrost toksyczności wraz ze wzrostem stężenia dla błękitu metylenowego. W przypadku mieszaniny, niskie stężenia powodowały efekt stymulacji luminescencji, z kolei

w przypadku roztworu indygo karminu w zakresie analizowanych stężeń zaobserwowano stymulację luminescencji. W analizowanych próbach roztworu barwnika indygo karminu przed jak i po procesie dekoloryzacji obserwowano stymulację bioluminescencji. Podczas dekoloryzacji błękitu metylenowego przy użyciu kapsułek enzymatycznych na bazie alginianu o wysokiej lepkości usunięcie barwnika zachodziło zarówno na drodze sorpcji, jak i biokatalizy, skutkując najwyższą całkowitą skutecznością usunięcia barwnika, a także redukcją inhibicji luminescencji w stosunku do kontrolnego roztworu barwnika. Wyniki testów toksyczności wskazują na różne mechanizmy usuwania barwników z ich mieszaniny. Analizy toksyczności próbek po dekoloryzacji mieszaniny, gdzie zastosowano kapsułki z enzymem rozpuszczonym w buforze i immobilizowanym na alginianie o wysokiej lepkości, wykazały wzrost toksyczności w stosunku do pierwotnego roztworu mieszaniny, zaznaczając, iż w tym przypadku również usunięcie indygo karminu i błękitu metylenowego z mieszaniny tych barwników było najniższe.

Tym samym uzyskałam odpowiedź na zdefiniowane pytanie badawcze:

Jak zmienia się toksyczność roztworów barwników i ich mieszaniny w zależności od stężenia? Jak zmienia się toksyczność roztworów barwników i ich mieszaniny po procesie dekoloryzacji przy użyciu immobilizowanej lakazy na bazie alginianu sodu?

9. Przeprowadzone testy dekoloryzacji indygo karminu, błękitu metylenowego i ich mieszaniny pozwoliły na określenie skuteczności procesu dekoloryzacji tych barwników i ich mieszaniny przy użyciu immobilizowanej lakazy na nośniku biopolimerowym o różnej lepkości. Optymalizacja procesu umożliwiła określenie dawki enzymu w przeliczeniu na 1 mg barwnika, jak i wyznaczenie optymalnej temperatury procesu. Ponadto dokonano identyfikacji mechanizmów dekoloryzacji barwników anionowych na przykładzie indygo karminu, barwników kationowych na przykładzie błękitu metylenowego oraz ich mieszaniny, w zależności od lepkości alginianu jako nośnika użytego do immobilizacji.

Tym samym rozwiązałam problem badawczy, którym było określenie skuteczności procesu dekoloryzacji barwników i ich mieszaniny przy użyciu immobilizowanej lakazy na nośniku biopolimerowym o różnej lepkości.

10. Dokonałam analizy możliwości zastosowania biopolimerów o różnej lepkości jako nośników do immobilizacji lakazy, w procesach dekoloryzacji barwników i ich mieszaniny.

Tym samym zrealizowałam cel naukowy pracy, który obejmował analizę możliwości zastosowania biopolimerów o różnej lepkości jako nośników do immobilizacji lakazy.

11. Na podstawie przeprowadzonych badań i uzyskanych wyników potwierdziłam, że możliwa jest dekoloryzacja barwników i ich mieszaniny przy użyciu immobilizowanej lakazy na nośniku biopolimerowym, przy czym proces ten zachodzi z różną skutecznością i poprzez różne mechanizmy.

Tym samym zweryfikowałam i potwierdziłam postawioną hipotezę badawczą o następującym brzmieniu: możliwa jest dekoloryzacja barwników i ich mieszaniny przy użyciu immobilizowanej lakazy na nośniku biopolimerowym.

12. Opracowana technologia immobilizacji lakazy na nośnikach biopolimerowych, do usuwania barwników ze ścieków stanowi istotny element wiedzy w obszarze nowoczesnych metod oczyszczania ścieków, a uzyskane wyniki mają znaczący wpływ na rozwój badań w zakresie immobilizowanych enzymów na nośnikach biopolimerowych, zwracając szczególną uwagę na właściwości biopolimerów stosowanych do immobilizacji.
13. Wyniki pracy umożliwiają także **określenie dalszego kierunku badań w celu maksymalizacji efektywności usuwania barwników przy użyciu immobilizowanych enzymów**, a w dalszej perspektywie potencjalnego zastosowania jako przyjaznej środowisku metody oczyszczania ścieków barwnych. Ponadto przeprowadzone badania stały się przyczynkiem do nakreślenia perspektyw dalszych badań w obszarze rozwoju technologii immobilizowanych enzymów do usuwania barwników ze ścieków.

9 LITERATURA

1. Abka-Khajouei, R., Tounsi, L., Shahabi, N., Patel, A.K., Abdelkafi, S. & Michaud, P. (2022) Structures, Properties and Applications of Alginates. *Marine Drugs*, 29, 20, 6, 664. DOI:10.3390/md20060364
2. Achieng, G.O., Kowenje, Ch.O., Lalah, J.O. & Ojwach S.O. (2019) Preparation, characterization of fish scales biochar and their applications in the removal of anionic indigo carmine dye from aqueous solutions. *Water Science & Technology*, 80, 11, 2218-2231. DOI:10.2166/wst.2020.040
3. Agrawal, K., Chaturvedi, V. & Verma, P. (2018) Fungal laccase discovered but yet undiscovered. *Bioresources and Bioprocessing*, 5, 4, 1–12, DOI:10.1186/s40643-018-0190-z
4. Ahlawat, A., Jaswal A.S. & Mishra, S. (2022) Proposed pathway of degradation of indigo carmine and its co-metabolism by whiterot fungus *Cyathus bulleri*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 172, 105424. DOI:10.1016/j.ibiod.2022.105424
5. Ahmed, S.H., Rasheed, E.A., Rasheed, L.A. & Abdulrahim, F.R. (2024) Decolorization of Cationic Dye from Aqueous Solution by Multiwalled Carbon Nanotubes. *Journal of Ecological Engineering*, 25, 2, 72-84. DOI: 10.12911/22998993/176210
6. Al-Tohamy, R., Ali, S.S. Li, F., Okasha, K.M., Mahmoud, Y.A-G., Elsamahy T., Jiao, H., Fu, Y. & Sun, J. (2022) A critical review on the treatment of dye-containing wastewater: Ecotoxicological and health concerns of textile dyes and possible remediation approaches for environmental safety. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 231, 113160. DOI:10.1016/j.ecoenv.2021.113160
7. Alvarado-Ramírez, L., Rostro-Alanis, M., Rodríguez-Rodríguez, J., Castillo-Zacarías, C., Sosa-Hernández, J.E., Barceló, D., Iqbal, H.M.N. & Parra-Saldívar, R. (2021) Exploring current tendencies in techniques and materials for immobilization of laccases - A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 181, 683-696. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2021.03.175
8. An, J., Li, G., Zhang, Y., Zhang, T., Liu, X., Gao, F., Peng, M., He, Y. & Fan, H. (2020) Recent Advances in Enzyme-Nanostructure Biocatalysts with Enhanced Activity. *Catalysts*, 10, 3, 338. DOI:10.3390/catal10030338
9. Asgher, M., Noreen, S. & Bilal, M. (2017a) Enhancing catalytic functionality of *Trametes versicolor* IBL-04 laccase by immobilization on chitosan microspheres. *Chemical Engineering Research and Design*, 119, 1-11, DOI:10.1016/j.cherd.2016.12.011
10. Asgher, M., Noreen, S. & Bilal, M. (2017b) Enhancement of catalytic, reusability, and longterm stability features of *Trametes versicolor* IBL-04 laccase immobilized on different polymers. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 54-62, DOI:10.1016/j.ijbiomac.2016.11.012.
11. Asgher, M., Shahid, M., Kamal, S. & Iqbal, H.M.N. (2014) Recent trends and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 101, 56–66. DOI:10.1016/j.molcatb.2013.12.016
12. Bagewadi, Z.K., Mulla, S.I. & Ninnekar, H.Z. (2017) Purification and immobilization of laccase from *Trichoderma harzianum* strain HZN10 and its application in dye

- decolorization. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15, 1, 139-150, DOI:10.1016/j.jgeb.2017.01.007
13. Baldrian P. (2006) Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*, 30, 2, 215-242. DOI:10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x
 14. Bautista, L.F., Morales, G. & Sanz, R. (2010) Immobilization strategies for laccase from *Trametes versicolor* on mesostructured silica materials and the application to the degradation of naphthalene, *Bioresource Technology*, 101, 22, 8541–8548. DOI:10.1016/j.biortech.2010.06.042
 15. Behera, M., Nayak, J., Banerjee, S., Chakraborty, S. & Tripathy, S.K. (2021) A review on the treatment of textile industry waste effluents towards the development of efficient mitigation strategy: an integrated system design approach, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9, 4, 105277. DOI:10.1016/j.jece.2021.105277
 16. Benkhaya, S., M'rabet, S. & El Harfi, A. (2020) A review on classifications, recent synthesis and applications of textile dyes. *Inorganic Chemistry Communications*, 115, 107891. DOI:10.1016/j.inoche.2020.107891
 17. Bertagnolli, C., Espindola, A.P.D.M., Kleinübing, S.J., Tasic, L. & da Silva, M.G.C. (2014) *Sargassum filipendula* alginate from Brazil: Seasonal influence and characteristics. *Carbohydrate Polymers*, 111, 619-623. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.05.024
 18. Bhowmik, S., Chakraborty, V. & Das, P. (2021) Batch adsorption of indigo carmine on activated carbon prepared from sawdust: a comparative study and optimization of operating conditions using Response Surface Methodology. *Results in Surfaces and Interfaces*, 3, 100011. DOI:10.1016/j.rsurfi.2021.100011
 19. Bilal, M., Asgher, M., Parra-Saldivar, R., Hu, H., Wang W., Zhang, X. & Iqbal H.M.N. (2017) Immobilized ligninolytic enzymes: an innovative and environmental responsive technology to tackle dye-based industrial pollutants - A review. *Science of The Total Environment*, 576, 646–659, DOI:10.1016/j.scitotenv.2016.10.137.
 20. Bilal, M., Rasheed, T., Nabeel, F. & Iqbal, H.M.N. (2019) Hazardous contaminants in the environment and their laccase-assisted degradation – A review. *Journal of Environmental Management*, 234, 253-264. DOI:10.1016/j.jenvman.2019.01.001
 21. Birhanli, E., Noma, S.A.A., Boran, F., Ulu, A., Yeşilada, Ö., Ateş, B. (2022) Design of laccase-metal-organic framework hybrid constructs for biocatalytic removal of textile dyes. *Chemosphere*, 292, 133382. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.133382
 22. Bolibok, P., Gembala, J., Wujak, M., Roszek, K., Terzyk, A.P. & Wiśniewski, M. (2016) Enzyme immobilization on carriers as a way of directed modification of biocatalysator properties. *Przemysł Chemiczny*, 95, 2254-2258. DOI: 10.15199/62.2016.11.22
 23. Brugnari, T., Contato, A.G., Pereira, M.G., Freitas, E.N. de Bubna, G.A., Aranha, G.M. & Peralta, R.M. (2020) Characterisation of free and immobilised laccases from *Ganoderma lucidum*: application on bisphenol A degradation. *Biocatalysis and Biotransformation*, 39, 1, 1-10. DOI: 10.1080/10242422.2020.1792448
 24. Castillo- Suárez, L.A., Sierra- Sánchez, A.G., Linares- Hernández, I., Martínez- Miranda, V., Teutli- Sequeira, E.A. (2023). A critical review of textile industry wastewater: green technologies for the removal of indigo dyes. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 20, 10553–10590. DOI:10.1007/s13762-023-04810-2

25. Castrovilli, M.C., Bolognesi, P., Chiarinelli, J., Avaldi, L., Cartoni, A., Calandra, P., Tempesta, E., Giardi, M.T., Antonacci, A., Arduini, F., Scognamiglio, V. (2020) Electrospray deposition as a smart technique for laccase immobilisation on carbon black-nanomodified screen-printed electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, 163, 112299. DOI:10.1016/j.bios.2020.112299
26. Chapman, J., Ismail, A.E. & Dinou, C.Z. (2018) Industrial of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks. *Catalysts*, 8, 6, 1–26. DOI:10.3390/catal8060238
27. Chee, S.Y., Wong, P.K. & Wong, C.L. (2011) Extraction and characterisation of alginate from brown seaweeds (Fucales, Phaeophyceae) collected from Port Dickson, Peninsular Malaysia. *Journal of Applied Phycology*, 23, 191-196. DOI:10.1007/s10811-010-9533-7
28. Chen, Z., Oh, W.-D. & Yap, P.-S. (2022) Recent advances in the utilization of immobilized laccase for the degradation of phenolic compounds in aqueous solutions: A review. *Chemosphere*, 307, Part 3, 135824. DOI:10.1016/j.chemosphere.2022.135824
29. Ching, S.H., Bansal, N. & Bhandari, B. (2017) Alginate gel particles-A review of production techniques and physical properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57, 1133-1152. DOI:10.1080/10408398.2014.965773
30. Choi, K.Y. (2021). Discoloration of indigo dyes by eco-friendly biocatalysts. *Dyes and Pigments*, 184, 108749. DOI:10.1016/j.dyepig.2020.108749
31. Claus H. (2003) Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Archives of Microbiology*, 179, 3, 145-150. DOI: 10.1007/s00203-002-0510-7
32. Daâssi, D., Rodríguez-Couto S., Nasri M. & Mechichi T. (2014) Biodegradation of textile dyes by immobilized laccase from *Coriopsis gallica* into Ca-alginate beads. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 90, 71-78. DOI:10.1016/j.ibiod.2014.02.006
33. Dalginli K.Y. & Atakisi O. (2023) Immobilization with Ca–Alg@ gelatin hydrogel beads enhances the activity and stability of recombinant thermoalkalophilic lipase. *Chemical and Process Engineering: New Frontiers*, 2023, 44, 1, e2. DOI: 10.24425/cpe.2023.14229
34. Deska, M. & Kończak B. (2020) Operational stability of laccases under immobilization conditions. *Przemysł Chemiczny*, 99, 3, 472-476. DOI:10.15199/62.2020.3.22
35. Deska, M. & Kończak, B. (2019) Immobilized fungal laccase as “green catalyst” for the decolourization process - State of the art. *Process Biochemistry*, 84, 112-123. DOI:10.1016/j.procbio.2019.05.024
36. Dong, Ch.-D., Tiwari, A., Anisha, G.S., Chen, Ch.-W., Singh, A., Haldar, D., Patel, A.K. & Singhania, R.R. (2023) Laccase: A potential biocatalyst for pollutant degradation. *Environmental Pollution*, 319, 120999. DOI: 10.1016/j.envpol.2023.120999
37. Drzymala, J. & Kalka, J. (2020) Elimination of the hormesis phenomenon by the use of synthetic sea water in a toxicity test towards *Allivibrio fischeri*. *Chemosphere*, 248, 126085. DOI:10.1016/j.chemosphere.2020.126085
38. Dwivedi, U., Singh, P., Pandey, V. & Kumar, A. (2011) Structure - function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68, 2, 117-128, DOI:10.1016/j.molcatb.2010.11.002
39. Enayatzamir, K., Alikhani, H.A., Yakhchali, B., Tabandeh, F. & Rodríguez-Couto, S. (2010) Decolouration of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* immobilized into

- alginate beads. *Environmental Science and Pollution Research*, 17, 1, 145-153. DOI:10.1007/s11356-009-0109-5
40. Ezike, T.C., Ezugwu, A.L., Udeh, J.O., Eze, S.O.O. & Chilaka, F.C. (2020) Purification and characterisation of new laccase from *Trametes polyzona* WRF03. *Biotechnology Reports*, 28, e00566. DOI:10.1016/j.btre.2020.e00566.
 41. Fernández-Fernández, M., Sanromán, M.Á. & Moldes, D. (2013) Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnology Advances*, 31, 1808–1825. DOI:10.1016/j.biotechadv.2012.02.013
 42. Fertah, M., Belfkira, A., Dahmane, E.M., Taourirte, M. & Brouillette F. (2017) Extraction and characterization of sodium alginate from Moroccan *Laminaria digitata* brown seaweed. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, 2, 3707-3714. DOI:10.1016/j.arabjc.2014.05.003
 43. Gahlout, M., Rudakiya, D.M., Gupte, S. & Gupte, A. (2017) Laccase-conjugated amino-functionalized nanosilica for efficient degradation of Reactive Violet 1 dye. *International Nano Letters*, 7, 3, 195-208. DOI: 10.1007/s40089-017-0215-1
 44. Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S. & Sannia, G. (2010) Laccases: a never-ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67, 369–385, DOI:10.1007/s00018-009-0169-1
 45. Gill, J., Orsat, V. & Kermash, S. (2018) Optimization of encapsulation of a microbial laccase enzymatic extract using selected matrices. *Process Biochemistry*, 65, 55-61. DOI:10.1016/j.procbio.2017.11.011
 46. Girelli, A.M. & Scuto, F.R. (2021) Eggshell membrane as feedstock in enzyme immobilization. *Journal of Biotechnology*, 325, 241-249. DOI:10.1016/j.jbiotec.2020.10.016
 47. Hamad, H.N. & Idrus, S. (2022) Recent Developments In The Application Of Bio-Waste-Derived Adsorbents For The Removal Of Methylene Blue From Wastewater: A Review. *Polymers (Basel)*, 14, 4, 783. DOI:10.3390/polym14040783
 48. Hanefeld, U., Gardossi, L., Magner, E. (2009) Understanding enzyme immobilization. *Chemical Society Reviews*, 2, 38, 453-468. DOI:10.1039/b711564b
 49. Hevira, L., Rahmayeni, Z., Ighalo, J.O. & Zein R. (2020) Biosorption of indigo carmine from aqueous solution by *Terminalia Catappa* shell, *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 8, 104290. DOI:10.1016/j.jece.2020.104290
 50. Holkar, C.R., Jadhav, A.J., Pinjari, D.V., Mahamuni, N.M. & Pandit, A.B. (2016) A critical review on textile wastewater treatments: Possible approaches. *Journal of Environmental Management*, 182, 351–366. DOI:10.1016/j.jenvman.2016.07.090
 51. Hurtado, A., Aljabali, A.A.A., Mishra, V., Tambuwala, M.M. & Serrano-Aroca, A. (2022) Alginate: Enhancement Strategies for Advanced Applications, *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 23, 9, 4486. DOI:10.3390/ijms23094486
 52. Intisar, A., Hedar, M., Sharif, A., Ahmed, E. Hussain, N., Hadibarata, T., Shariati, M.A., Smaoui, S. (2023) Chapter 21 - Enzyme immobilization on alginate biopolymer for biotechnological applications, in: *Developments in Applied Microbiology and Biotechnology, Microbial Biomolecules*, Kumar, A., Bilal, M., Ferreira, L.F.R., Kumari, M. (Eds). Academic Press, 471-488. DOI:10.1016/B978-0-323-99476-7.00008-9

53. Irshad, M., Bahadur, B.A., Anwar, Z., Yaqoob, M., Ijaz, A. & Iqbal, H. M.N. (2012) Decolorization applicability of sol-gel matrix-immobilized laccase produced from *Ganoderma leucidum* using agro-industrial waste. *BioResources*, 7, 3, 4249-4261. DOI:10.15376/biores.7.3.4249-4261
54. Jafri, N.A.A., Rahman, R.A. & Ali, N. (2021) A Short Review on Recent Development of Laccase Immobilization on Different Support Materials. *Journal of Sustainable Natural Resources*, 2, 1, 54-63. DOI:10.30880/jsunr.2021.02.01.008
55. Jaiswal, N., Pandey, V.P. & Dwivedi, U.N. (2016) Immobilization of papaya laccase in chitosan led to improved multipronged stability and dye discoloration. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86, 288–295. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2016.01.079
56. Jeyabalan, J., Veluchamy, A., Priyan V, V., Kumar, A., Chandrasekar, R. & Narayanasamy, S. (2023) A review on the laccase assisted decolourization of dyes: Recent trends and research progress. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 151, 105081. DOI:10.1016/j.jtice.2023.105081
57. Kandelbauer, A., Kessler, W., Kessler, R.W. (2008) Online UV-visible spectroscopy and multivariate curve resolution as powerful tool for model-free investigation of laccase-catalysed oxidation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390, 5, 1303–1315. DOI:10.1007/s00216-007-1791-0
58. Katheresan V., Kandedo, J. & Lau, S.Y. (2018) Efficiency of Various Recent Wastewater Dye Removal Methods: A Review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6, 4, 4676-4697. DOI:10.1016/j.jece.2018.06.060
59. Khajouei R.A., Keramat, J., Hamdami, N., Ursu, A.-V. & Delattre, C., Gardarin, Ch.Lecerf, D., J. Desbrières J., Djelveh, G., Michaud, P. (2021) Effect of high voltage electrode discharge on the physicochemical characteristics of alginate extracted from an Iranian brown seaweed (*Nizimuddinina zanardini*). *Algal Research*, 56, 102326. DOI:10.1016/j.algal.2021.102326
60. Khan, I., Saeed, K., Zekker, I. & Zhang, B. (2022) Review on Methylene Blue: Its Properties, Uses, Toxicity and Photodegradation. *Water*. 14,2, 242. DOI:10.3390/w14020242
61. Kishor, R., Purchase, D., Saratale, G.D., Saratale, R.G., Ferreira, L.F.R., Bilal, M., Chandra, R. & Bharagava, R.N. (2021) Ecotoxicological and health concerns of persistent coloring pollutants of textile industry wastewater and treatment approaches for environmental safety. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9, 2, 105012. DOI:10.1016/j.jece.2020.105012
62. Kofidis, T., Strüber, M., Wilhelmi, M., Anssar, M., Simon, A., Harringer, W. & Haverich A. (2001) Reversal of severe vasoplegia with single-dose methylene blue after heart transplantation. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 122, 4, 823-824. DOI:10.1067/mtc.2001.115153
63. Kyomuhimbo, H.D. & Brink, H.G. (2023) Applications and immobilization strategies of the copper-centred laccase enzyme; a review. *Heliyon*. 9, 2, e13156. DOI:10.1016/j.heliyon.2023.e13156
64. Łabowska, M., Izabela, M. & Jerzy, D. (2019) Methods of Extraction, Physicochemical Properties of Alginates and Their Applications in Biomedical Field—a Review. *Open Chemistry*, 17, 1, 738–762. DOI:10.1515/chem-2019-0077

65. Lassouane, F., Aït-Amar, H. & Rodriguez-Couto, S. (2022) High BPA removal by immobilized crude laccase in a batch fluidized bed bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 184, 108489. DOI:10.1016/j.bej.2022.108489
66. Lassouane, F., Aït-Amar, H., Amrani, S. & Rodriguez-Couto, S. (2019) A promising laccase immobilization approach for Bisphenol A removal from aqueous solutions. *Bioresource Technology*, 271, 360-367. DOI:10.1016/j.biortech.2018.09.129
67. Latif, A., Maqbool, A., Sun, K., Si, Y. & Fernandez-Lafuente, R. (2023) Enzyme Immobilization. *Molecules* 2023, 28, 1373. DOI:10.3390/molecules28031373
68. Latif, A., Maqbool, A., Sun, K. & Si, Y. (2022) Immobilization of *Trametes versicolor* laccase on Cu-alginate beads for biocatalytic degradation of bisphenol A in water: Optimized immobilization, degradation and toxicity assessment. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10, 1, 107089. DOI: 10.1016/j.jece.2021.107089
69. Lee, K.Y. & Mooney, D.J. (2012) Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37, 106–126. DOI:10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003
70. Lellis, B., Fávaro-Polonio, C.Z., Pamphile, J.A. & Polonio, J.C. (2019) Effects of textile dyes on health and the environment and bioremediation potential of living organisms. *Biotechnology Research and Innovation*, 3, 275-290. DOI: 10.1016/j.biori.2019.09.001
71. Leontieș, A.R., Răducan, A., Culiță, D.C., Alexandrescu, E., Moroșan, A., Mihaiescu, D.E. & Aricov L. (2022) Laccase immobilized on chitosan-polyacrylic acid microspheres as highly efficient biocatalyst for naphthol green B and indigo carmine degradation. *Chemical Engineering Journal*, 439, 135654. DOI:10.1016/j.cej.2022.135654
72. Li, S., Cui, Y., Wen, M. & Ji G. (2023) Toxic Effects of Methylene Blue on the Growth, Reproduction and Physiology of *Daphnia magna*. *Toxics*, 11, 7, 594. DOI:10.3390/toxics11070594
73. Liese, A. & Hilterhaus, L. (2013) Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. *Chemical Society Reviews*, 42, 6236-6249. DOI:10.1039/C3CS35511J
74. Liu, J., Shen, X., Zheng, Z., Li, M., Zhu, X., Cao, H., Cui, C. (2020) Immobilization of laccase by 3D bioprinting and its application in the biodegradation of phenolic compounds. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 518-525. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2020.07.144
75. Lzaod, S. & Dutta, T. (2022) Biotransformation of 4,4'-dihydroxybiphenyl and dienestrol by laccase from *Trametes versicolor*. *Journal of Hazardous Materials Advances*, 8, 100169. DOI:10.1016/j.hazadv.2022.100169
76. Ma, J., Lin, Y., Chen, X., Zhao, B. & Zhang, J. (2014) Flow Behavior, Thixotropy and Dynamical Viscoelasticity of Sodium Alginate Aqueous Solutions. *Food Hydrocolloids*, 38, 119–128. DOI:10.1016/j.foodhyd.2013.11.016
77. Ma, J., Lin, Y., Chen, X., Zhao, B. & Zhang, J. (2014) Flow Behavior, Thixotropy and Dynamical Viscoelasticity of Sodium Alginate Aqueous Solutions. *Food Hydrocolloids*, 38, 119-128. DOI:10.1016/j.foodhyd.2013.11.016
78. Madhavi, V. & Lele, S.S. (2009) Laccase: properties and applications, *BioResources*, 4, 4, 694-1717, DOI: 10.15376/biores.4.4.1694-1717
79. Malinowski, S., Herbert, P.A.F., Rogalski, J., Jaroszyńska-Wolińska, J. (2018) Laccase Enzyme Polymerization by Soft Plasma Jet for Durable Bioactive Coatings. *Polymers*, 10, 5, 532. DOI:10.3390/polym10050532

80. Manavalan, T., Manavalan, A. & Heese, K. (2015) Characterization of lignocellulolytic enzymes from white-rot fungi. *Current Microbiology*, 70, 485–498. DOI:10.1007/s00284-014-0743-0
81. Marszałek, A. (2022) Encapsulation of halloysite with sodium alginate and application in the adsorption of copper from rainwater, *Archives of Environmental Protection*, 48, 1, 75–82. DOI: 10.24425/aep.2022.140546
82. Martínez-Cano, B., Mendoza-Meneses, C.J., García-Trejo, J.F., Macías-Bobadilla, G., Aguirre-Becerra, H., Soto-Zarazúa, G.M. & Feregrino-Pérez, A.A. (2022) Review and Perspectives of the Use of Alginate as a Polymer Matrix for Microorganisms Applied in Agro-Industry, *Molecules*, 27, 13, 4248. DOI:10.3390/ molecules27134248
83. Mateo, C., Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M. & Fernandez-Lafuente R. (2007) Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 40,6,1451-1463. DOI:10.1016/j.enzmictec.2007.01.018
84. Mayer, A.M. & Staples, R.C. (2002) Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, 60, 6, 551-565, DOI:10.1016/S0031-9422(02)00171-1
85. Mayer, A.M., Staples, R.C. (2002) Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, 60, 551. DOI:10.1016/S0031-9422(02)00171-1
86. Michalska, J., Turek-Szytow, J., Dudło, A. & Surmacz-Górska, J. (2022) Characterization of humic substances recovered from the sewage sludge and validity of their removal from this waste. *EFB Bioeconomy Journal*, 2, 100026. DOI:10.1016/j.bioeco.2022.100026
87. Minussi, R.C., Pastore, G.M., Durán, N. (2002) Potential applications of laccase in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 13, 6-7, 205–216. DOI:10.1016/S0924-2244(02)00155-3
88. Mohamad, N.R., Marzuki, N.H.C., Buang, N.A., Huyop, F., Wahab, R.A. (2015) An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29, 2, 205-220. DOI:10.1080/13102818.2015.1008192 29, 205.
89. Mohammadi, M., As'habi, M.A., Salehi, P., Yousefi, M., Nazari, M., Brask, J. (2018) Immobilization of laccase on epoxy-functionalized silica and its application in biodegradation of phenolic compounds. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 443–447. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.12.102
90. Mohan, C, Yadav S., Uniyal, V, Taskaeva, N. & Kumari N. (2022) Interaction of Indigo carmine with naturally occurring clay minerals: An approach for the synthesis of nanopigments. *Materials Today: Proceedings*, 69, 2, 82-86. DOI:10.1016/j.matpr.2022.08.081
91. Moon, S., Ryu J., Hwang, J. & Lee, C.G. (2023) Efficient removal of dyes from aqueous solutions using short-length bimodal mesoporous carbon adsorbents. *Chemosphere*, 313, 137448. DOI:10.1016/j.chemosphere.2022.137448
92. Moorthy, A.K., Rathi, B.G., Shukla S.P., Kumar K. & Bharti, V.S. (2021) Acute toxicity of textile dye Methylene blue on growth and metabolism of selected freshwater microalgae. *Environmental Toxicology Pharmacology*, 82, 103552. DOI:10.1016/j.etap.2020.103552

93. Morsy, S.A.G.Z., Ahmad Tajudin A., Ali M.S.M. & Shariff F.M. (2020) Current Development in Decolorization of Synthetic Dyes by Immobilized Laccases. *Frontiers in Microbiology*, 11, 572309. DOI: 10.3389/fmicb.2020.572309
94. Nair, R.R. Demarche, P. & Agathos, S.N. (2013) Formulation and characterization of an immobilized laccase biocatalyst and its application to eliminate organic micropollutants in wastewater. *New Biotechnology*. 30, 6 814–823. DOI:10.1016/j.nbt.2012.12.004
95. Naseem, S., Rawal, R.S., Pandey, D. & Suman, S.K. (2023) Immobilized laccase: an effective biocatalyst for industrial dye degradation from wastewater. *Environmental Science and Pollution Research*, 30, 36, 84898-84917. DOI:10.1007/s11356-023-28275-5
96. Oktaviani, M., Damin, B.C.S., Suryanegara, L., Yanto, D.H.Y. & Watanabe, T. (2024) Immobilization of fungal mycelial and laccase from *Trametes hirsuta* EDN082 in alginate-cellulose beads and its use in Remazol Brilliant Blue R dye decolorization. *Bioresource Technology Reports*, 26, 101828. DOI:10.1016/j.biteb.2024.101828
97. Oladoye, P.O., Ajiboye, T.O., Omotola, E.O. & Oyewola, O.J. (2022) Methylene blue dye: Toxicity and potential elimination technology from wastewater. *Results in Engineering*, 16, 100678. DOI:10.1016/j.rineng.2022.100678
98. Olajuyigbe, F.M., Adetuyi, O.Y., Fatokun, C.O., (2019) Characterization of free and immobilized laccase from *Cyberlindnera fabianii* and application in degradation of bisphenol A. *International Journal of Biological Macromolecules*, 125, 856-864. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2018.12.106
99. Ortner, A., Hofer, K., Bauer, W., Nyanhongo, G.S. & Guebitz, G.M. (2018) Laccase modified lignosulfonates as novel binder in pigment based paper coating formulations. *Reactive and Functional Polymers*, 123, 20-25, DOI:10.1016/j.reactfunctpolym.2017.12.005
100. Paraschiv, G., Ferdes, M., Ionescu, M., Moiceanu, G., Zabava, B.S. & Dinca, M.N. (2022) Laccases - Versatile Enzymes Used to Reduce Environmental Pollution. *Energies*, 15, 5, 1835. DOI:10.3390/en15051835
101. Park, C., Lee, M., Lee, B., Kim, S.-W., Chase, H.A., Lee, J. & Kim, S. (2007) Biodegradation and biosorption for decolourisation of synthetic dyes by *Funalia trogii*. *Biochemical Engineering Journal*, 36, 1, 59-65. DOI:10.1016/j.bej.2006.06.007
102. Pereira Gonçalves, M.C., Kieckbusch, T.G., Perna, R.F., Fujimoto, J.T., Morales, S.A. & Romanelli, J.P. (2019) Trends on enzyme immobilization researches based on bibliometric analysis. *Process Biochemistry*, 76, 95-110. DOI:10.1016/j.procbio.2018.09.016
103. Peteiro C., (2018) Alginate production from marine macroalgae, with emphasis on kelp farming, w: Rehm, B.H.A., Moradali F. (Red.) *Alginates and Their Biomedical Applications*, Springer Series in Biomaterials Science and Engineering, Springer, Singapore, 27–66. DOI:10.1007/978-981-10-6910-9_2
104. Polak-, J. & Jarosz-Wilkolazka, A. (2007) Reakcje katalizowane przez lakazę - mechanizm i zastosowanie w biotechnologii. *BIOTECHNOLOGIA* 4, 79, 82-94.
105. Polak, J. & Jarosz-Wilkolazka, A. (2010) Whole-cell fungal transformation of precursors into dyes. *Microbial Cell Factories*, 9, 51, 1–12. DOI: 10.1186/1475-2859-9-51

106. Puspita, K., Chiari, W., Abdulmajid, S.N., Idroes, R. & Iqhrammullah, M. (2022) Four Decades of Laccase Research for Wastewater Treatment: Insights from Bibliometric Analysis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20, 1, 308, DOI: 10.3390/ijerph20010308
107. Radoor, S., Karayil, J., Jayakumar, A., Parameswaranpillai, J., Lee, J. & Siengchin, S. (2022) Ecofriendly And Low-Cost Bio Adsorbent For Efficient Removal Of Methylene Blue From Aqueous Solution. *Scientific Reports*, 12, 20580. DOI:10.1038/s41598-022-22936-0
108. Rane A., Joshi, S.J. (2021) Biodecolorization and Biodegradation of Dyes: A Review. *Open Biotechnology Journal*, 15, 1, 97-108. DOI:10.2174/1874070702115010097
109. Rao, M.A., Scelza, R., Acevedo, F., Diez, M.C., Gianfreda, L. (2014) Enzymes as useful tools for environmental purposes. *Chemosphere*, 107, 145-162, DOI:10.1016/j.chemosphere.2013.12.059
110. Ratanapongleka K. & Punbut S. (2018) Removal of acetaminophen in water by laccase immobilized in barium alginate. *Environmental Technology (United Kingdom)*, 39, 3, 336-345. DOI:10.1080/09593330.2017.1301563
111. Rehbein, P., Raguz, N., Schwalbe, H. (2019) Evaluating mechanical properties of silica-coated alginate beads for immobilized enzyme catalysis. *Biochemical Engineering Journal*, 141, 225-231. DOI: 10.1016/j.bej.2018.10.028
112. Rendón-Castrillón, L., Ramírez-Carmona, M., Ocampo-López, C., González-López, F., Cuartas-Uribe, B., Mendoza-Roca, J.A. (2024) Efficient bioremediation of indigo-dye contaminated textile wastewater using native microorganisms and combined bioaugmentation-biostimulation techniques. *Chemosphere*, 353, 141538. DOI:10.1016/j.chemosphere.2024.141538
113. Reyes, P., Pickard, M.A. & Vazquez-Duhalt, R. (1999) Hydroxybenzotriazole increases the range of textile dyes decolorized by immobilized laccase. *Biotechnology Letters*, 21, 875-880
114. Rhein-Knudsen, N., Ale, M.T., Ajalloueian, F. & Meyer, A.S. (2017) Characterization of alginates from Ghanaian brown seaweeds: *Sargassum* spp. and *Padina* spp. *Food Hydrocolloids*, 71, 236-244. DOI:10.1016/j.foodhyd.2017.05.016
115. Ristea, M.E. & Zarnescu, O. (2023) Indigo Carmine: Between Necessity and Concern. *Journal of Xenobiotics*. 13, 3, 509-528. DOI:10.3390/jox13030033
116. Rodrigues, R.C., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R. & Fernández-Lafuente, R. (2013) Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chemical Society Reviews*, 42, 15, 6290–6307. DOI:10.1039/c2cs35231a
117. Rodriguez-Couto, S. (2015) Chapter 5 Fungal laccase in the textile industry, w: *Fungal biomolecules. Sources, application and recent developments*. Gupta, V.K., Mach, R.L., Sreenivasaprasad, S. (Red.) John Wiley & Sons, 2015
118. Saoudi, O. & Ghaouar, N. (2019) Biocatalytic characterization of free and immobilized laccase from *Trametes versicolor* in its activation zone. *International Journal of Biological Macromolecules*, 128, 681-691. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2019.01.199
119. Sathishkumar, P., Kamala-Kannan, S., Cho, M., Kim, J.S., Hadibarata, T., Salim, M.R. & Oh, B.-T. (2014) Laccase immobilization on cellulose nanofiber: The catalytic efficiency and recyclic application for simulated dye effluent treatment. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 100, 111–120. DOI: 10.1016/j.molcatb.2013.12.008

120. Shah, S.S., Ramos, B. & Silva Costa Teixeira, A.C. (2022) Adsorptive Removal Of Methylene Blue Dye Using Biodegradable Superabsorbent Hydrogel Polymer Composite Incorporated With Activated Charcoal. *Water*, 14, 20, 3313. DOI:10.3390/w14203313
121. Sharma, A., Thakur, V.V., Shrivastava, A., Jain, R.K., Mathur, R.M., Gupta, R., Kuhad R.C. (2014) Xylanase and laccase based enzymatic kraft pulp bleaching reduces adsorbable organic halogen (AOX) in bleach effluents: a pilot scale study. *Bioresource Technology*, 169, 96–102. DOI:10.1016/j.biortech.2014.06.066.
122. Sharma, J., Sharma, S., Soni, V. (2021) Classification and impact of synthetic textile dyes on Aquatic Flora: A review. *Regional Studies in Marine Science*, 45, 101802. DOI: 10.1016/j.rsma.2021.101802
123. Shokri, Z., Seidi, F., Karami, S., Li, Ch., Saeb, M.R. & Xiao, H. (2021). Laccase immobilization onto natural polysaccharidies for biosensing and biodegradation. *Carbohydrate Polymers*. 262, 117963. DOI:10.1016/j.carbpol.2021.117963
124. Silva, T.H., Alves, A., Ferreira, B.M., Oliveira, J.M., Reys, L.L., Ferreira, R.J.F., Sousa, R.A., Silva, S.S., Mano, J.F. & Reis, R.L. (2012) Materials of marine origin: a review on polymers and ceramics of biomedical interest. *International Materials Reviews*, 57, 5, 276-306. DOI:10.1179/1743280412Y.0000000002
125. Singh, G., Capalash, N., Kaur, K., Puri, S. & Sharma, P. (2016) Enzymes: applications in pulp and paper industry, w: Dhillon, G., Kaur, S. (Red.) *Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production. Apply and Exploit the Emerging and Valuable Use Options of Waste Biomass*, Academic Press, 2016, 157–172
126. Slama, H.B., Bouket, A.Ch., Pourhassan, Z., Alenezi, F.N., Silini, A., Cherif-Silini, H., Oszako, T., Luptakova, L., Golińska, P. & Belbahri, L. (2021) Diversity of Synthetic Dyes from Textile Industries, Discharge Impacts and Treatment Methods. *Applied Sciences*, 11, 4, 6255. DOI:10.3390/app11146255
127. Sondhi, S., Kaur, R., Kaur, S. & Kaur, P.S. (2018) Immobilization of laccase-ABTS system for the development of a continuous flow packed bed bioreactor for decolorization of textile effluent. *International Journal of Biological Macromolecules*. 117, 1093-1100. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2018.06.007
128. Suman, S.K., Patnam, P.L., Ghosh, S., Jain, S.L. (2019) Chicken Feather Derived Novel Support Material for Immobilization of Laccase and Its Application in Oxidation of Veratryl Alcohol. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7, 3, 3464-3474. DOI:10.1021/acssuschemeng.8b05679
129. Sun, H., Yang, H., Huang, W., Zhang, S. (2015) Immobilization of laccase in a sponge-like hydrogel for enhanced durability in enzymatic degradation of dye pollutants. *Journal of Colloid and Interface Science*, 450 (2015), 353–360. DOI: 10.1016/j.jcis.2015.03.037
130. Teerapatsakul, C., Parra, R., Keshavarz, T. & Chitradon, L. (2017) Repeated batch for dye degradation in an airlift bioreactor by laccase entrapped in copper alginate. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 120, 52-57. DOI:10.1016/j.ibiod.2017.02.001
131. Thirumavalavan, M. (2023) Functionalized chitosan and sodium alginate for the effective removal of recalcitrant organic pollutants. *Macromolecules*, 234, 125276. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2023.125276

132. Tkaczyk. A., Mitrowska, K. & Posyniak A. (2020) Synthetic organic dyes as contaminants of the aquatic environment and their implications for ecosystems: A review. *Science of the Total Environment*, 717, 137222. DOI:10.1016/j.scitotenv.2020.137222
133. Tripathi, M., Singh, S., Pathak, S., Kasaudhan, J., Mishra, A., Bala, S., Garg, D., Singh, R., Singh, P., Singh, P.K., Shukla, A.K., Pathak, N. (2023) Recent Strategies for the Remediation of Textile Dyes from Wastewater: A Systematic Review. *Toxics*, 11, 11, 940. DOI:10.3390/toxics11110940
134. Tyagi, N., Gambhir, K., Pandey, R., Gangenahalli, G. & Verma, Y.K. (2021) Minimizing the negative charge of Alginate facilitates the delivery of negatively charged molecules inside cells. *Journal of Polymer Research*, 29, 1. DOI:10.1007/s10965-021-02813-6
135. Vautier, M., Guillard, C., Herrmann, J.M. (2001) Photocatalytic degradation of dyes in water: Case study of indigo and of indigo carmine. *Journal of Catalysis*, 201, 46–59. DOI:10.1006/jcat.2001.3232
136. Viswanath, B., Rajesh, B., Janardhan, A., Kumar, A.P., Narasimha, G. (2014) Fungal laccases and their applications in bioremediation. *Enzyme Research*, 2014, 163242–163253. DOI:10.1155/2014/163242.
137. Wang, Ch., Wang, S., Zhang, J., Jiang, S., Cui, D., Sun, H., Liu, Ch., Li, L. & Zhao, M. (2022) The Biodegradation of Indigo Carmine by *Bacillus safensis* HL3 Spore and Toxicity Analysis of the Degradation Products. *Molecules*, 27, 23, 8539. DOI:10.3390/molecules27238539
138. Wang, J. Lu, L. & Feng, F. (2017) Improving the Indigo Carmine Decolorization Ability of a *Bacillus amyloliquefaciens* Laccase by Site-Directed Mutagenesis. *Catalysts*, 7, 275. DOI:10.3390/catal7090275.
139. Wang, X. & Meng, F. (2024) Construction of a continuous packed bed laccase reactor for the elimination of tetracyclines in seawater. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 12, 2, 111939. DOI: 10.1016/j.jece.2024.111939
140. Wong, J.K.H., Tan, H.K., Lau, S.Y., Yap, P.-S. & Danquah, M.K. (2019) Potential and challenges of enzyme incorporated nanotechnology in dye wastewater treatment: A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7, 4, 103261. DOI:10.1016/j.jece.2019.103261
141. Wu, K., Shi, M., Pan X., Zhang, J., Zhang, X., Shen, T. & Tian, Y. (2022) Decolourization and biodegradation of methylene blue dye by a ligninolytic enzyme-producing *Bacillus thuringiensis*: Degradation products and pathway. *Enzyme and Microbial Technology*, 156, 109999. DOI:10.1016/j.enzmictec.2022.109999
142. Yadav, H. & Karthikeyan, Ch. (2019) 1-Natural polysaccharides: Structural features and properties. *Polysaccharide Carriers for Drug Delivery*. 1-17. DOI:10.1016/B978-0-08-102553-6.00001-5
143. Yang, J., Li, W., Ng, T.B., Deng, X., Lin, J. & Ye, X. (2017) Laccases: production, expression regulation, and applications in pharmaceutical biodegradation. *Frontiers Microbiology*, 8, 832, 1–24, DOI:10.3389/fmicb.2017.00832
144. Yavaşer, R. & Karagözler, A.A. (2021) Laccase immobilized polyacrylamide-alginate cryogel: A candidate for treatment of effluents. *Process Biochemistry*, 101, 137-146. DOI:10.1016/j.procbio.2020.11.021

145. Ye, J., Chu, T., Chu, J., Gao, B. & He, B. (2019) A Versatile Approach for Enzyme Immobilization Using Chemically Modified 3D-Printed Scaffolds. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7, 21, 18048-18054. DOI: 10.1021/acssuschemeng.9b04980
146. Yoshida, H. (1883) Chemistry of lacquer (urushi) part 1. Communication from the Chemical Society of Tokio. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 43, 472-486, DOI:10.1039/CT8834300472
147. Younes, S.B., Mechichi, T. & Sayadi, S. (2007) Purification and characterization of the laccase secreted by the white rot fungus *Perenniporia tephropora* and its role in the decolourization of synthetic dyes. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 1033-1042. DOI:10.1111/j.1365-2672.2006.03152.x
148. Zahirinejad, S., Hemmati, R., Homaei, A., Dinari, A., Hosseinkhani, S., Mohammadi, S. & Vianello, F. (2021) Nano-organic supports for enzyme immobilization: Scopes and perspectives. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 204, 111774. DOI:10.1016/j.colsurfb.2021.111774
149. Zdarta J., Meyer, A.S., Jesionowski, T. & Pinelo, M. (2018a) A General Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: Characteristics, Properties, Practical Utility. *Catalysts*, 8, 2, 92. DOI:10.3390/catal8020092
150. Zdarta, J., Meyer, A.S., Jesionowski, T. & Pinelo, M. (2018b) Developments in support materials for immobilization of oxidoreductases: A comprehensive review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 258, 1-20. DOI:10.1016/j.cis.2018.07.004.
151. Zdarta, J., Frankowski, R., Zgoła-Grześkowiak, A., Ehrlich, H. & Jesionowski, T. (2018c) The effect of operational parameters on the biodegradation of bisphenols by *Trametes versicolor* laccase immobilized on *Hippospongia communis* spongin scaffolds. *Science of The Total Environment*, 615, 784-795. DOI:10.1016/j.scitotenv.2017.09.213
152. Zein, R., Hevira, L., Zilfa, Rahmayeni, Fauzia, S. & Ighalo J.O. (2022) The Improvement of Indigo Carmine Dye Adsorption by *Terminalia catappa* Shell Modified with Broiler Egg White. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 13, 13795-13812. DOI:10.1007/s13399-021-02290-3
153. Zhang S., Dong, J., Pan, R., Xu, Z., Li, M. & Zang, R. (2023) Structures, Properties, and Bioengineering Applications of Alginates and Hyaluronic Acid. *Polymers*, 15, 9, 2149. DOI:10.3390/polym15092149
154. Zhang, Y., Yin, M., Sun, X. & Zhao, J. (2020) Implication for adsorption and degradation of dyes by humic acid: Light driven of environmentally persistent free radicals to activate reactive oxygen species. *Bioresource Technology*, 307, 123183. DOI:10.1016/j.biortech.2020.123183
155. Zheng, F., Cui, B.-K., Wu, H.-J., Meng, G., Liu, H.-X. & Si, J. (2016) Immobilization of laccase onto chitosan beads to enhance its capability to degrade synthetic dyes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 110, 69-78. DOI:10.1016/j.ibiod.2016.03.004
156. Zhou, W., Zhang, W. & Cai, Y. (2021) Laccase immobilization for water purification: A comprehensive review. *Chemical Engineering Journal*, 403, 126272. DOI:10.1016/j.cej.2020.126272
157. Zhou, Z.-W., Liu, Ch.-X., Wang, N. & Yu, X.-Q. (2023) Co-immobilization of laccase and PEG modified COFs into Cu doped gel beads to achieve synergistic effect of photocatalysis and enzymatic catalysis for pollutants removal. *Colloids and Surfaces*

A: Physicochemical and Engineering Aspects, 656, Part A, 130201.
DOI:10.1016/j.colsurfa.2022.130201

158. <https://www.consilium.europa.eu/pl/press/press-releases/> (dostęp z dnia: 19.04.2024)

10 SPIS RYSUNKÓW

Rysunek 1 Typy reakcji katalizowanych przez lakazę	26
Rysunek 2 Immobilizacja lakazy metodą wkraplania	36
Rysunek 3 Metody immobilizacji lakazy: 1a) atomizer \varnothing 0,5 mm; 1b) atomizer \varnothing 1,4 mm; 1c) atomizer \varnothing 2,0 mm, 1d) wkraplacz z igłą dozującą \varnothing 0,45 mm.....	41
Rysunek 4 Wpływ pH na aktywność wolnej (FL) i immobilizowanej lakazy przy użyciu alginianu sodu (AL-L).....	44
Rysunek 5 Utlenianie ABTS przez alginianowe kapsułki enzymatyczne w a) pH 5, b) pH 7.45	
Rysunek 6 Aktywność a) wolnej lakazy (FL) oraz b) immobilizowanej lakazy (AL-L) w temperaturze 21 - 60°C.....	46
Rysunek 7 Widma Ramana zarejestrowane dla: a) enzymu lakazy (w postaci proszku) (E), czas ekspozycji 10 s, b) kapsułek alginianowych bez enzymu (AL) oraz powierzchni kapsułek alginianowych z lakazą (ALe surface) i przekroju poprzecznego kapsułek alginianowych z lakazą (ALe section), czas ekspozycji 5 s.....	50
Rysunek 8 Kapsułka bezpośrednio po przygotowaniu a) kapsułka alginianowa z enzymem (ALe), b) kapsułka alginianowa bez enzymu (AL)	51
Rysunek 9 Zmiany parametrów geometrycznych kapsułek alginianowych z enzymem (ALe) i bez enzymu (AL) w funkcji czasu: a) współczynnik kształtu, b) kolistość c) długość, d) szerokość.....	52
Rysunek 10 Skuteczność dekoloryzacji indygo karminu przy użyciu kapsułek alginianowych z immobilizowaną lakazą a) dla różnych dawek enzymu na 1 mg barwnika IC w ciągu 40 dni w 21°C, b) z identyfikacją dominującego mechanizmu dekoloryzacji.....	53
Rysunek 11 Widma absorpcyjne UV-VIS roztworu indygo karminu (IC) przed i po procesie dekoloryzacji, przy użyciu immobilizowanej lakazy (40 dni, temperatura: 21°C, dawka enzymu: 320 mg E/mg IC)	55
Rysunek 12 Wpływ temperatury (21, 30 i 40°C) na skuteczność dekoloryzacji indygo karminu w czasie 20 dni, dawka enzymu: 320 mg/mg IC.....	57
Rysunek 13 Lepkość badanych roztworów alginianu sodu (2%) w temperaturze 21°C i 30°C.....	61
Rysunek 14 Dekoloryzacja indygo karminu: a) odbarwienie przy użyciu alginianowych kapsułek enzymatycznych, b) sorpcja na kapsułkach alginianowych.....	62
Rysunek 15 Dekoloryzacja błękitu metylenowego: a) odbarwienie przy użyciu alginianowych kapsułek enzymatycznych, b) sorpcja na kapsułkach alginianowych.....	64

Rysunek 16 Dekoloryzacja indygo karminu w mieszaninie a) odbarwianie przy użyciu alginianowych kapsułek enzymatycznych, b) sorpcja na kapsułkach alginianowych66

Rysunek 17 Dekoloryzacja błękitu metylenowego w mieszaninie a) odbarwianie przy użyciu alginianowych kapsułek enzymatycznych, b) sorpcja na kapsułkach alginianowych67

11 SPIS TABEL

Tabela 1 Właściwości testowanych alginianów sodu.....	33
Tabela 2 Właściwości testowanych barwników	34
Tabela 3 Parametry techniczne atomizerów do otrzymywania mikroksułek enzymatycznych	35
Tabela 4 Perspektywy dalszych badań w obszarze rozwoju technologii immobilizowanych enzymów do usuwania barwników ze ścieków	71

12 ZAŁĄCZNIKI

ZAŁĄCZNIK NR 1. INFORMACJA O DOROBKU NAUKOWYM

Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską

1. **Deska, M.** & Kończak B. (2019) Immobilized fungal laccase as "green catalyst" for the decolourization process – State of the art. *Process Biochemistry*, 84, 112-123. DOI:10.1016/j.procbio.2019.05.024 (IF = 4,4; MNiSW = 70 pkt)
2. **Deska, M.** & Kończak, B. (2020) Stabilność operacyjna lakaz w warunkach immobilizacji. *Przemysł Chemiczny*, 99, 472-476. DOI:10.15199/62.2020.3.22 (IF = 0,5; MNiSW = 70 pkt)
3. **Deska, M.** & Kończak, B. (2022) Nośniki do immobilizacji lakazy w procesach dekoloryzacji. *Przemysł Chemiczny*, 101, 135-139. DOI:10.15199/62.2022.2.9 (IF = 0,5; MNiSW = 70 pkt)
4. **Deska, M.** & Kończak, B. (2022) Laccase Immobilization on Biopolymer Carriers – Preliminary Studies. *Journal of Ecological Engineering*, 23, 4, 235-249. DOI:10.12911/22998993/146611 (IF = 1,3; MNiSW = 70 pkt)
5. **Białowas, M.**, Kończak, B., Chałupnik, S., Kalka, J. & Cempa, M. (2024) Alginate-laccase beads in the decolourization of indigo carmine. *Archives of environmental protection*, 50, 1, 45-55. DOI:10.24425/aep.2024.149431 (IF = 1,5; MNiSW = 100 pkt)
6. **Białowas, M.**, Kończak, B., Chałupnik, S. & Kalka, J. (2024) Analysis of the feasibility of using biopolymers of different viscosities as immobilisation carriers for laccase in synthetic dye removal. *Archives of environmental protection*, 50, 1, 19-34. DOI:10.24425/aep.2024.149429 (IF = 1,5; MNiSW = 100 pkt)

Wykaz innych publikacji naukowych

1. **Deska, M.**, Głodniok, M. & Ulfig, K. (2018) Coal Enrichment Methods by Using Microorganisms and Their Metabolites. *Journal of Ecological Engineering*, 19, 2, 213-220
2. Zawartka, P., Kruczek, M. & **Deska, M.** (2018) Zastosowanie metody LCA do wspomagania decyzji środowiskowych w gospodarce wodno-ściekowej. *Zeszyty Naukowe Politechniki Śląskiej. Organizacja i Zarządzanie*, 117, 91-107
3. Kruczek, M. & **Deska, M.** (2018) The role of stakeholders in the entrepreneurial discovery process. *Organizacja i Zarządzanie. Kwartalnik Naukowy*, 43, 3, 51-66
4. **Deska, M.** (2020) Activity of antioxidant enzymes under induced oxidative stress. *Journal of Ecological Engineering*, 21, 7, 42-51
5. Głodniok, M. & **Deska, M.** (2020) Wpływ oleju kreozytowego na aktywność oddechową osadu czynnego. *Przemysł Chemiczny*, 99, 6, 919-922
6. Łabaj, P., Wysocka, M., Janson, E. & **Deska, M.** (2020) Application of the Unified Stream Assessment Method to Determine the Direction of Revitalization of Heavily Transformed Urban Rivers. *Water Resources*, 47, 4, 521-529

7. Deska, M. & Zawadzki, P. (2021) Nowoczesne metody usuwania barwników syntetycznych ze ścieków przemysłowych. *Przemysł Chemiczny*, 100, 7, 664-667
8. Zawadzki, P. & **Deska, M.** (2021) Odbarwianie roztworów błękitu metylenowego w zaawansowanych procesach utleniania za pomocą rodników siarczanowych i hydroksylowych. *Przemysł Chemiczny*, 100, 3, 286-288
9. Zawadzki, P. & **Deska, M.** (2021) Degradation Efficiency and Kinetics Analysis of an Advanced Oxidation Process Utilizing Ozone, Hydrogen Peroxide and Persulfate to Degrade the Dye Rhodamine B. *Catalysts*, 11, 8, 974
10. Kończak, B., Cempa, M., Pierzchała, Ł. & **Deska M.** (2021) Assessment of the ability of roadside vegetation to remove particulate matter from the urban air. *Environmental Pollution*, 268(B), 115465
11. Markowska, M., Kruczek, M. & **Deska, M.** (2022) The Role of Entrepreneurial Discovery Process in Technological Development of Silesian Voivodeship. *Zeszyty Naukowe Politechniki Śląskiej. Organizacja i Zarządzanie*, 155, 249-270

Rozdziały monografii

1. Jędrysik E., Rejman-Burzyńska A. Krzemień J. & **Deska M.** (2014) Budowanie kompetencji i podnoszenie świadomości społecznej celem wspomagania działań na rzecz poprawy jakości powietrza - projekt TAB . Ochrona powietrza w teorii i praktyce. Tom II. Praca zbiorowa pod red. J. Konieczynskiego. Zabrze, IPIŚ PAN
2. Kończak B., Klus L., Klus, M., **Białowas M.** & Zawartka P. (2023) Innowacje w przemyśle opakowaniowym uwzględniające zasady gospodarki o obiegu zamkniętym. Innowacyjna Zielona Gospodarka. Tom 5. Nowe horyzonty dla EkoInnowacji. Praca zbiorowa pod. red. M. Kruczka, Katowice, Główny Instytut Górnictwa

Materiały konferencyjne spoza wykazu MNiSW

Głodniok, M., **Deska, M.**, Kaszycki, P. Impact of stabilized sewage sludge-based granulated fertilizer on *Sinapis alba* growth and biomass chemical characteristics, in Proceedings of the 1st International Electronic Conference on Agronomy, 3–17 May 2021, MDPI: Basel, Switzerland

Uzyskane patenty

1. Głodniok, M., Korol, J., Zawartka, P., Krawczyk, B., **Deska, M.** Patent nr 233754, Sposób otrzymywania nawozu organicznego z ustabilizowanych komunalnych osadów ściekowych oraz nawóz organiczny z ustabilizowanych komunalnych osadów ściekowych (patent wdrożony)
2. Zawartka, P., Kończak, B., **Deska, M.** Patent nr 238701, Sposób otrzymywania nawozu z ustabilizowanych osadów poprocesowych ściekowych i nawóz z ustabilizowanych osadów poprocesowych ściekowych.

Nagrody

Złoty Medal przyznany przez Jury Konkursowe XIV Wirtualnej Międzynarodowej Warszawskiej Wystawy Wynalazków „IWIS 2020” za „Technologię otrzymywania nawozu organicznego z ustabilizowanych osadów ściekowych” autorstwa: Głodniok, M., Korol, J., Zawartka, P., **Deska, M.**, Krawczyk B.; Warszawa, 21.10.2020 r.

Konferencje

1. **Deska, M.** (2020) Proces wytwarzania kapsułek polimerowych do immobilizacji enzymów o potencjalnym zastosowaniu w procesach usuwania barwników ze ścieków, Konferencja „Innowacyjne pomysły młodych naukowców: Nauka - Start'up – Przemysł”, 12.05.2020

Wykaz innych aktywności naukowych

Realizacja prac statutowych w charakterze kierownika pracy:

1. „Sposób immobilizacji enzymów biorących udział w biodegradacji barwników”, okres realizacji: 07.2018-12.2018, nr pracy w GIG-PIB: 14508017-343
2. „Efektywność biodegradacji barwników z wykorzystaniem enzymatycznych mikrosfer polimerowych w zmiennych warunkach środowiskowych”, okres realizacji: 01.2019 – 12.2019, nr pracy w GIG-PIB: 11358019-343
3. „Badania stabilności operacyjnej enzymatycznych kapsułek polimerowych”, okres realizacji: 01.2020 – 12.2020, nr pracy w GIG-PIB: 11358010-343
4. „Optymalizacja kapsułek enzymatycznych do potencjalnego zastosowania w usuwaniu barwników ze ścieków”, okres realizacji: 01.2021 – 12.2021, nr pracy w GIG-PIB: 11331011-343

Ww. prace sfinansowano w ramach środków na badania statutowe finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego przyznanych dla Głównego Instytutu Górnictwa-Państwowego Instytutu Badawczego.

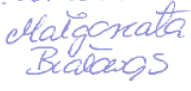

ZAŁĄCZNIK NR 2. OŚWIADCZENIA WSPÓLAUTORÓW PUBLIKACJI
STANOWIĄCYCH ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ

Oświadczenie o współautorstwie – publikacja 1

Oświadczenie współautorów publikacji

Niniejszym podaję procentowy wkład autorski w publikację pt.:

Deska, M. & Kończak B. (2019) Immobilized fungal laccase as "green catalyst" for the decolourization process – State of the art. *Process Biochemistry*, 84, 112-123. DOI:10.1016/j.procbio.2019.05.024

Imię i nazwisko współautora	Procentowy wkład autorski	Wkład autorów w publikację	Data i podpis współautora
Małgorzata Białowąs	75%	<ul style="list-style-type: none">– koncepcja i projekt,– zebranie i analiza danych,– napisanie artykułu,– krytyczne zrecenzowanie artykułu,– ostateczna akceptacja artykułu.	29.05.2024 
Beata Kończak	25%	<ul style="list-style-type: none">– koncepcja i projekt,– analiza danych,– krytyczne zrecenzowanie artykułu,– ostateczna akceptacja artykułu.	05.06.2024 

Oświadczenie o współautorstwie – publikacja 2

Oświadczenie współautorów publikacji

Niniejszym podaję procentowy wkład autorski w publikację pt.:

Deska, M. & Kończak, B. (2020) Stabilność operacyjna lakaz w warunkach immobilizacji.
Przemysł Chemiczny, 99, 472-476. DOI:10.15199/62.2020.3.22

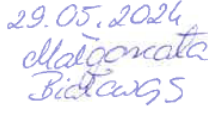

Imię i nazwisko współautora	Procentowy wkład autorski	Wkład autorów w publikację	Data i podpis współautora
Małgorzata Białowas	80%	<ul style="list-style-type: none">– koncepcja i projekt,– zebranie i analiza danych,– napisanie artykułu,– krytyczne zrecenzowanie artykułu,– ostateczna akceptacja artykułu.	29.05.2020 Małgorzata Białowas
Beata Kończak	20%	<ul style="list-style-type: none">– koncepcja i projekt,– analiza danych,– krytyczne zrecenzowanie artykułu,– ostateczna akceptacja artykułu.	05.06.2020 Beata Kończak

Oświadczenie o współautorstwie – publikacja 3

Oświadczenie współautorów publikacji

Niniejszym podaję procentowy wkład autorski w publikację pt.:

Deska, M. & Kończak, B. (2022) Nośniki do immobilizacji lakazy w procesach dekoloryzacji.
Przemysł Chemiczny, 101, 135-139. DOI:10.15199/62.2022.2.9

Imię i nazwisko współautora	Procentowy wkład autorski	Wkład autorów w publikację	Data i podpis współautora
Małgorzata Białowas	80%	<ul style="list-style-type: none">– koncepcja i projekt,– zebranie i analiza danych,– napisanie artykułu,– krytyczne zrecenzowanie artykułu,– ostateczna akceptacja artykułu.	29.05.2024 
Beata Kończak	20%	<ul style="list-style-type: none">– koncepcja i projekt,– analiza danych,– krytyczne zrecenzowanie artykułu,– ostateczna akceptacja artykułu.	05.06.2024 

Oświadczenie o współautorstwie – publikacja 4

Oświadczenie współautorów publikacji

Niniejszym podaję procentowy wkład autorski w publikację pt.:

Deska, M. & Kończak, B. (2022) Laccase Immobilization on Biopolymer Carriers – Preliminary Studies. *Journal of Ecological Engineering*, 23, 4, 235-249. DOI:10.12911/22998993/146611

Imię i nazwisko współautora	Procentowy wkład autorski	Wkład autorów w publikację	Data i podpis współautora
Małgorzata Białowas	75%	<ul style="list-style-type: none">– koncepcja i projekt,– zebranie i zestawienie danych,– analiza i interpretacja wyników,– napisanie artykułu.	29.05.2024 Małgorzata Białowas
Beata Kończak	25%	<ul style="list-style-type: none">– koncepcja i projekt,– analiza i interpretacja wyników,– napisanie artykułu,– krytyczne zrecenzowanie artykułu,– ostateczna akceptacja artykułu.	05.06.2024 Beata Kończak

Oświadczenie o współautorstwie – publikacja 5

Oświadczenie współautorów publikacji

Niniejszym podaję procentowy wkład autorski w publikację pt.:

Białowąż, M., Kończak, B., Chałupnik, S., Kalka, J. & Cempa, M. (2024) Alginate-laccase beads in the decolourization of indigo carmine. *Archives of environmental protection*, 50, 1, 45-55. DOI:10.24425/aep.2024.149431

Imię i nazwisko współautora	Procentowy wkład autorski	Wkład autorski w publikację	Data i podpis współautora
Małgorzata Białowąż	70%	<ul style="list-style-type: none">– koncepcja i projekt,– zebranie i zestawienie danych,– analiza i interpretacja wyników,– napisanie artykułu,– krytyczne zrecenzowanie artykułu,– ostateczna akceptacja artykułu.	29.05.2024 Małgorzata Białowąż
Beata Kończak	10%	<ul style="list-style-type: none">– koncepcja i projekt,– analiza i interpretacja wyników,– krytyczne zrecenzowanie artykułu,– ostateczna akceptacja artykułu.	05.06.2024 Beata Kończak
Stanisław Chałupnik	10%	<ul style="list-style-type: none">– koncepcja i projekt,– krytyczne zrecenzowanie artykułu,– ostateczna akceptacja artykułu.	29.05.2024 Stanisław Chałupnik
Joanna Kalka	5%	<ul style="list-style-type: none">– krytyczne zrecenzowanie artykułu,– ostateczna akceptacja artykułu.	04/06/24 Joanna Kalka
Magdalena Cempa	5%	<ul style="list-style-type: none">– analiza i interpretacja wyników,– ostateczna akceptacja artykułu.	03.06.2024 Magdalena Cempa

Oświadczenie o współautorstwie – publikacja 6

Oświadczenie współautorów publikacji

Niniejszym podaję procentowy wkład autorski w publikację pt.:

Białowas, M., Kończak, B., Chałupnik, S. & Kalka, J. (2024) Analysis of the feasibility of using biopolymers of different viscosities as immobilisation carriers for laccase in synthetic dye removal. *Archives of environmental protection*, 50, 1, 19-34. DOI:10.24425/aep.2024.149429

Imię i nazwisko współautora	Procentowy wkład autorski	Wkład autorów w publikację	Data i podpis współautora
Małgorzata Białowas	74%	<ul style="list-style-type: none">– koncepcja i projekt,– zebranie i zestawienie danych,– analiza i interpretacja wyników,– napisanie artykułu,– krytyczne zrecenzowanie artykułu,– ostateczna akceptacja artykułu.	29.05.2024 Małgorzata Białowas
Beata Kończak	10%	<ul style="list-style-type: none">– koncepcja i projekt,– analiza i interpretacja wyników,– krytyczne zrecenzowanie artykułu,– ostateczna akceptacja artykułu.	05.06.2024 Beata Kończak
Stanisław Chałupnik	8%	<ul style="list-style-type: none">– koncepcja i projekt,– krytyczne zrecenzowanie artykułu,– ostateczna akceptacja artykułu.	18.06.2024 Stanisław Chałupnik
Joanna Kalka	8%	<ul style="list-style-type: none">– zebranie i zestawienie danych,– ostateczna akceptacja artykułu.	04/06/24 Joanna Kalka

ZAŁĄCZNIK NR 3. PUBLIKACJE STANOWIĄCE ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ