

Gdańsk, 17 września 2024 r.

Prof. dr hab. inż. Jacek Mąkinia
Politechnika Gdańska
Wydział Inżynierii Lądowej i Środowiska
Katedra Inżynierii Sanitarnej

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Białowas pt. „Opracowanie technologii immobilizacji lakazy na nośnikach biopolimerowych do usuwania barwników ze ścieków”

przygotowanej pod opieką **dr. hab. inż. Stanisława Chałupnika, prof. GIG-PIB** (promotora)
oraz **dr inż. Beaty Kończak** (promotora pomocniczego).

1. Podstawa do opracowania recenzji

Formalną podstawą do opracowania niniejszej recenzji jest oficjalne pismo Dyrektora GIG-PIB, Pana Jarosława Zagórowskiego, z dn. 22 lipca 2024 r. (numer NOP/164/2024/R).

2. Ocena formalna rozprawy

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska składa się z sześciu tematycznie spójnych publikacji, w tym trzech przeglądowych i trzech oryginalnych. Artykuły przeglądowe zostały opublikowane w czasopismach *Process Biochemistry* (IF = 4,4; 70 pkt MNiSW) oraz *Przemysł Chemiczny* (dwa artykuły) (IF = 0,5; 70 pkt MNiSW). Prace oryginalne ukazały się w *Journal of Ecological Engineering* (IF = 1,3; 70 pkt MNiSW) oraz *Archives of Environmental Protection* (dwa artykuły) (IF = 1,5; 100 pkt MNiSW). Dwa artykuły przeglądowe w czasopiśmie *Przemysł Chemiczny* zostały napisane w języku polskim, natomiast pozostałe publikacje powstały w języku angielskim. We wszystkich przypadkach Kandydatka była pierwszym współautorem.

Według załączonych oświadczeń współautorów, deklarowany wkład Kandydatki wynosił 70-80%. Obejmował on głównie opracowanie koncepcji i projektu badań, zebranie i analizę danych oraz przygotowanie wstępnej wersji publikacji.

Publikacje te są załącznikami do obszernego podsumowania, które liczy łącznie 102 strony. Dokument ten, oprócz wykazu publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, zawiera także wprowadzenie do tematyki badawczej, cel i zakres pracy, przegląd literatury związanej z podjętą tematyką badawczą, opis metodyki badań, analizę wyników badań i ich

dyskusję, perspektywy dalszych badań, a także podsumowanie i wnioski. Ta część rozprawy została starannie opracowana zarówno pod względem językowym, jak i edytorskim.

3. Ocena aktualności i celowości podjęcia wybranej tematyki badawczej

Barwniki syntetyczne są powszechnie stosowane w różnych gałęziach przemysłu, szczególnie w sektorze tekstylnym. Ze względu na swoją stabilność chemiczną i odporność na degradację, stanowią one poważne wyzwanie w kontekście ich skutecznego usuwania ze ścieków. Ich obecność w wodach powierzchniowych może zaburzać funkcjonowanie ekosystemów wodnych, a także stanowić zagrożenie dla zdrowia ludzkiego, co podkreśla potrzebę opracowania efektywnych metod oczyszczania ścieków.

Enzym lakaza, wykazujący zdolność degradacji szerokiego spektrum związków organicznych, w tym barwników, jest jednym z najbardziej obiecujących biokatalizatorów stosowanych w biotechnologii środowiskowej. W jednej z najnowszych prac przeglądowych (Tite i wsp. 2024), autorzy wskazali, że „lakaza stała się jedną z najpopularniejszych opcji bioremediacji ze względu na swoją szeroką specyficzną substratową i zdolność do rozkładania różnych rodzajów zanieczyszczeń organicznych”. Immobilizacja lakazy na nośnikach biopolimerowych znacząco poprawia jej stabilność, aktywność oraz możliwość wielokrotnego użycia, co jest kluczowe z punktu widzenia zastosowań przemysłowych. Ponadto, wykorzystanie biopolimerów jako nośników do immobilizacji enzymów wpisuje się w trend zrównoważonego rozwoju, gdyż biopolimery są biodegradowalne i często pozyskiwane z odnawialnych źródeł.

Podjęta przez Kandydatkę problematyka badawcza jest aktualna i ważna. W rozprawie w sposób syntetyczny przedstawiono zarys tematyki badawczej (rozdział 2. Wprowadzenie) oraz właściwie uzasadniono jej podjęcie (rozdział 3.1 Cel naukowy pracy z uzasadnieniem podjętej tematyki badawczej), podając sześć kluczowych przesłanek, w tym potrzebę opracowywania zrównoważonych metod usuwania toksycznych barwników ze ścieków, zwiększenie stabilności biokatalizatorów przez ich immobilizację, oraz badanie właściwości alginianów jako nośników enzymów. Podjęta problematyka badawcza ma również istotne znaczenie praktyczne, ponieważ zaproponowane podejście może znacząco przyczynić się do rozwoju skutecznych i zrównoważonych metod oczyszczania ścieków. Może też ułatwić wdrażanie koncepcji gospodarki o obiegu zamkniętym (GOZ) w zarządzaniu gospodarką wodno-ściekową w zakładach przemysłowych.

Tite i wsp. (2024). Exploration of Free and Immobilized Biocatalysts for the Treatment of Paper Industry Effluents, Separation & Purification Reviews, DOI: 10.1080/15422119.2024.2382313

4. Ocena merytoryczna rozprawy

CEL BADAŃ, PROBLEM i HIPOTEZA BADAWCZA

Kandydatka poprawnie sformułowała dwa cele rozprawy: cel naukowy określony jako „*analiza możliwości zastosowania biopolimerów o różnej lepkości jako nośników do immobilizacji lakazy*”, oraz cel użyteczny określony jako „*ocena możliwości usuwania barwników ze ścieków poprzez zastosowanie technologii immobilizacji lakazy na nośnikach biopolimerowych*”. Oba cele wyraźnie rozróżniają zagadnienia teoretyczne (cel naukowy) od praktycznych zastosowań (cel użyteczny). Warto jednak zwrócić uwagę, że cel użyteczny mógłby zawierać bardziej szczegółowe określenie ocenianych aspektów (np. efektywność usuwania konkretnych typów barwników) oraz kontekst ich zastosowania (np. badania laboratoryjne czy testy w skali technicznej).

Problem badawczy, dotyczący „określenia skuteczności procesu dekoloryzacji barwników i ich mieszaniny przy użyciu immobilizowanej lakazy na nośniku biopolimerowym o różnej lepkości”, został dobrze sformułowany i bezpośrednio powiązany z wyznaczonym celem badawczym. Natomiast hipoteza badawcza, która brzmi „*możliwa jest dekoloryzacja barwników i ich mieszaniny przy użyciu immobilizowanej lakazy na nośniku biopolimerowym*”, wydaje się nieco zbyt ogólna, co może utrudniać jej weryfikację, a także nie jest dostatecznie powiązana z problemem badawczym (np. poprzez uwzględnienie różnych lepkości nośnika).

PRZEGLĄD LITERATURY

Przeгляд literatury, przedstawiony w trzech publikacjach, dobrze odzwierciedla aktualny stan wiedzy na temat zastosowania immobilizowanej lakazy w procesach dekoloryzacji ścieków. Omówione w publikacjach zagadnienia obejmują zastosowanie lakazy jako „*zielonego katalizatora*” (**Publikacja 1**), stabilność operacyjną enzymów w procesie immobilizacji (**Publikacja 2**), oraz różnorodne nośniki stosowane do immobilizacji lakazy (**Publikacja 3**). Zagadnienia te są ściśle powiązane z celami rozprawy i stanowią solidną podstawę teoretyczną do rozwiązania problemu badawczego.

Najbardziej wartościową częścią przeglądu jest **Publikacja 1**, która ukazała się w renomowanym czasopiśmie **Process Biochemistry**. Kandydatka opisała w niej potencjał lakazy jako biokatalizatora do usuwania barwników ze ścieków, szczególnie podkreślając korzyści płynące z immobilizacji, takie jak poprawa stabilności enzymu oraz jego większa odporność na niekorzystne warunki procesowe. Wskazała również, na podstawie wyników dotychczasowych badań, że immobilizacja lakazy stanowi technologię, która może znacząco poprawić efektywność degradacji różnych rodzajów barwników.

Publikacja 2 skupia się na aspektach związanych z katalizą enzymatyczną, w tym na równaniu Michalisa-Menten oraz wpływie parametrów, takich jak pH i stabilność termiczna, na działanie enzymów. Kandydatka szczegółowo omówiła wpływ immobilizacji na stabilność enzymów, podkreślając, że poprawia ona stabilność biokatalizatorów w szerokim zakresie pH i temperatur, a także umożliwia ich wielokrotne wykorzystanie. Istotnym elementem tej publikacji jest także wskazanie aktualnych kierunków prowadzonych badań nad opracowaniem nowymi, stabilnych nośników do immobilizacji enzymów.

Publikacja 3 koncentruje się na metodach immobilizacji oraz nowoczesnych materiałach stosowanych do immobilizacji lakazy w procesach dekoloryzacji. Kandydatka trafnie wskazała na rosnące zainteresowanie wykorzystaniem biokatalizatorów w przemyśle, szczególnie poprzez techniki immobilizacji enzymów, które zwiększają wydajność i stabilność operacyjną enzymów.

Przegląd literatury jest szczegółowy i dobrze opracowany, jednak należy zauważyć brak istotnej pracy Abadulla i wsp. (2000), posiadającej ponad 550 cytowań w bazie Web of Science, która mogłaby poszerzyć kontekst badań nad enzymatycznym usuwaniem barwników.

Abadulla i wsp. (2000) Decolorization and Detoxification of Textile Dyes with a Laccase from *Trametes hirsuta*. *Appl Environ Microbiol.*, 66, 3357-3362. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.8.3357-3362.2000>.

METODYKA BADAŃ

W części technologicznej rozprawy opisano serię badań laboratoryjnych, które Kandydatka przeprowadziła z wykorzystaniem lakazy z *Trametes versicolor* jako enzymu modelowego. Wybór ten został poprawnie uzasadniony na podstawie przeglądu literatury, gdzie podkreślono szeroką specyficzność substratową lakazy oraz jej przydatność w procesach dekoloryzacji barwników. Kandydatka zastosowała dwa rodzaje nośników biopolimerowych (alginian sodu, chitozan) oraz nośnik kombinowany (alginianowo-chitozanowy). Wybór biopolimerów, wynikający z braku toksyczności, biodegradowalności i biokompatybilności, został również dobrze uzasadniony w publikacjach przeglądowych.

Badania przeprowadzono przy użyciu dwóch metod wytwarzania kapsułek: atomizera oraz metody wkraplania za pomocą igły dozującej, co ukazuje różnorodność podejść do procesu immobilizacji. Plan badań został logicznie skonstruowany, co umożliwiło osiągnięcie postawionych celów szczegółowych rozprawy. Opisy eksperymentów są precyzyjne, zawierają listę wszystkich użytych materiałów, ich źródła oraz szczegółowe procedury badawcze.

Badania wstępne, opisane w **Publikacji 4**, dotyczyły wpływu warunków środowiskowych na trwałość kapsułek oraz ich stabilność podczas magazynowania. Zastosowano dwie metody wytwarzania kapsułek: za pomocą trzech rodzajów atomizerów oraz metodę wkraplania. Wskaźnikiem efektywności immobilizacji była jej wydajność, czyli stosunek aktywności immobilizowanego enzymu do aktywności enzymu wolnego. Badano również sorpcję na nośniku bez immobilizowanego enzymu w dwóch temperaturach 30°C i 40°C. Dodatkowo analizowano wpływ temperatury magazynowania immobilizowanych enzymów przez okres 21 dób w trzech temperaturach: -10°C, 4°C i 21°C.

W dalszym etapie badań, opisanym w **Publikacji 5**, Kandydatka podjęła próbę optymalizacji usuwania barwnika (indygo karminu), badając wpływ dawki enzymu i temperatury na efektywność procesu. Kapsułki wytworzono na bazie alginianu sodu, metodą opisaną we wcześniejszej publikacji. Metodyka tego etapu została dobrze zaplanowana, a szeroki zakres zmiennych pozwolił na uzyskanie obszernego zbioru danych eksperymentalnych. Warto podkreślić zastosowanie optycznego analizatora cząstek oraz spektrometrii Ramana do potwierdzenia obecności lakazy wewnątrz i na powierzchni kapsułek.

Ostatni etap badań, opisanym w **Publikacji 6**, obejmował badanie wpływu lepkości biopolimerów na skuteczność usuwania dwóch barwników syntetycznych (błękit metylenowy i indygo karmin) oraz ich mieszaniny. Metoda produkcji kapsułek była zbliżona do opisanej we wcześniejszych pracach. Procedury badawcze zostały szczegółowo opisane, a do oceny zastosowano wskaźnik tzw. całkowitej skuteczności usuwania barwnika, który obejmował sorpcję i biokatalizę, a także wskaźniki określające oddzielnie efektywność każdego z tych procesów. Dodatkowo przeprowadzono testy toksyczności w urządzeniu Microtox, zgodnie z procedurą zalecaną przez USEPA.

Odnosnie do przyjętej metodyki badań nasuwa się kilka uwag i pytań:

1. Brak uwzględnienia parametrów kinetycznych w równaniu Michaelisa-Mentena, takich jak maksymalna jednostkowa szybkość reakcji enzymatycznej (v_{max}) oraz stała nasycenia (Michaelisa) (K_M), stanowi istotną lukę, zwłaszcza że były one omawiane w przeglądzie literatury (**Publikacja 2**). W podsumowaniu (s. 42), Kandydatka wskazuje na stosowanie tego równania do oceny wydajności katalitycznej enzymów, odwołując się do wyników z **Publikacji 4**, jednak w samej publikacji pominięto omówienie tych parametrów.
2. Istotnym ograniczeniem jest też skupienie się na analizie efektywności procesu usuwania barwników, pomijając jednocześnie pomiar szybkości procesu, która jest kluczowym parametrem w projektowaniu układów oczyszczania ścieków.
3. Zastosowanie różnych czasów reakcji (od 10 do 40 dób) nie zostało przyjęte wystarczająco uzasadnione w kontekście procesu dekoloryzacji barwników. Na przykład, w **Publikacji 5**, badanie usuwania barwników zakończono po 40 dobach w temperaturze 21°C (s. 47), mimo że widoczny jest brak stabilizacji stężeń w końcowej fazie badań (rysunek 5, s. 51). W badaniach wpływu temperatury na usuwanie barwników (również w **Publikacji 5**) czas reakcji wynosił 20 dób, natomiast w **Publikacji 6** (s. 24), testy prowadzono przez 10 dób w temperaturze 30°C. Warto zauważyć, że w przeglądzie literatury (Tabela 2 w **Publikacji 1**) podane są znacznie krótsze czasy reakcji - od 16 minut do 72 godzin.
4. Zakres badań optymalizacyjnych, opisanych w **Publikacji 5**, obejmował porównanie efektywności procesu dla trzech dawek enzymu (w jednej temperaturze) oraz temperatury procesu (stosując jedną dawkę enzymu). Taki zakres wydaje się niewystarczający do uzyskania pełnej wiedzy na temat optymalnych warunków procesu. Warto przy tym zauważyć, że w rozprawie badano również wpływ czasu reakcji (rysunek 5, s. 51), chociaż w rozprawie bezpośrednio o tym nie wspomniano.
5. Wybór długiego czasu sorpcji (ponad 28 godzin) oraz czasu przechowywania immobilizowanych enzymów (21 dób) (**Publikacja 4**, s. 238) był dokonywany arbitralnie, bez jasnego uzasadnienia.
6. W **Publikacji 5** brakuje jasnego uzasadnienia doboru szerokiego zakresu dawek enzymu (20, 40 oraz 320 mg enzymu/mg barwnika). Taki dobór nie wydaje się wystarczający do przeprowadzenia badań optymalizacyjnych.

7. Nie jest konieczne wprowadzenie dwóch wskaźników: dekoloryzacji oraz całkowitej skuteczności usuwania barwnika, jeżeli są one zdefiniowane w ten sam sposób (równania 2 i 3 w podsumowaniu, s. 38). Należy też zwrócić uwagę na błąd, który pojawił się w zapisie tych równań (współczynnik 100 powinien występować w liczniku, a nie mianowniku).

WYNIKI BADAŃ I ICH DYSKUSJA

Wszystkie trzy prace oryginalne (**Publikacje 4-6**) przedstawiają kompleksowe i dobrze udokumentowane wyniki badań, które zostały odpowiednio poparte danymi literaturowymi.

(**Publikacja 4**) Kandydatka zaprezentowała wstępne badania nad oceną różnych metod wytwarzania trzech nośników biopolimerowych oraz ich zastosowania do immobilizacji lakazy. Szeroki zakres badań świadczy o ambitnym podejściu Kandydatki już we wczesnym etapie pracy. Ze względu na obszerność tematu, wyniki mogą wydawać się nieco rozproszone, co utrudnia ich pełną interpretację.

Wkraplanie z użyciem alginianu sodu zostało uznane za najskuteczniejszą metodę immobilizacji lakazy, mimo stosunkowo niskiej wydajności immobilizacji (34%). Kapsułki alginianowe wykazały również dobre właściwości sorpcyjne w odniesieniu do błękitu metylenowego (MB), osiągając 55% skuteczności sorpcji w zakresie temperatur 30-40°C. Wyższą wydajność immobilizacji (77%) uzyskano przy zastosowaniu nośnika alginianowo-chitozanowego, jednak w tym przypadku pojawiły się pęknięcia i uszkodzenia kapsułek, co wskazuje na pogorszenie ich właściwości fizycznych.

Przechowywanie kapsułek w temperaturze 4°C, bez obecności wody, pozwoliło na zachowanie 75% początkowej aktywności enzymu po 21 dobach. Należy jednak zauważyć, że testy przeprowadzono tylko w trzech temperaturach, co uniemożliwia jednoznaczne określenie optymalnych warunków przechowywania. Stwierdzono, że w temperaturze 21°C aktywność spadła poniżej 60%, a w -10°C poniżej 20% wartości początkowej. Ponadto, zaobserwowano niestabilny spadek aktywności immobilizowanej lakazy w zakresie temperatur 21-60°C (rysunek 6a), co przypisano uwalnianiu enzymu do roztworu i jego szybszej degradacji w wyższych temperaturach. Dla porównania, wolna lakaza osiągnęła najwyższą aktywność w temperaturze 30°C, co wskazuje na odmienną zależność temperaturową (rysunek 6b).

(**Publikacja 5**) Głównym celem badań 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*” (s. 53). Kandydatka przyjęła interpretację optymalizacji w szerokim ujęciu, skupiając się na znalezieniu najlepszego rozwiązania w określonych warunkach, bez wykorzystania metod matematycznych i szczegółowych obliczeń. Stąd też akceptowalne jest podejście, która zastosowała Kandydatka, polegające na porównaniu efektywności usuwania barwnika dla: (i) trzech dawek enzymu (20, 40 oraz 320 mg enzymu/mg barwnika) w określonej temperaturze (21°C), (ii) trzech temperatur (21, 30 oraz 40°C) przy najwyższej dawce enzymu (320 mg enzymu/mg barwnika).

Najwyższą efektywność dekoloryzacji uzyskano przy zastosowaniu najwyższej dawki enzymu (320 mg E/mg IC), osiągając ponad 90% po 40 dobach reakcji (rysunek 5a). W kontekście

optymalizacji procesu i praktycznych zastosowań warto jednak zauważyć, o czym Kandydatka nie wspomina w tekście, że po 20 dobach efektywność osiągnęła już blisko 80%, natomiast 8-krotnie mniejsza dawka spowodowała ponad dwukrotnie niższą efektywność po 40 dobach (osiągając około 40%).

W przypadku barwnika anionowego (IC), dominującym mechanizmem usuwania była biokataliza. Proces sorpcji był mniej znaczący, z efektywnością w zakresie 5-7%, a jego udział w usuwaniu barwnika zwiększał się wraz z redukcją dawki enzymu. Kandydatka zauważyła, że proces sorpcji „może być także istotny dla optymalizacji kosztów odbarwiania ścieków” (s. 54), jednak w rozprawie zabrakło szczegółowej analizy opłacalności tego rozwiązania.

(Publikacja 6): Głównym celem badań było określenie wpływu lepkości nośnika biopolimerowego (alginianu sodu) na skuteczność usuwania różnych barwników oraz ich mieszaniny, a także identyfikacja głównego mechanizmu dekoloryzacji. W przypadku barwnika anionowego (IC), dominującym mechanizmem usuwania była biokataliza, co potwierdza wcześniejsze wyniki opisane w **Publikacji 5**. Niezależnie od lepkości nośnika, efektywność usuwania IC była stosunkowo wysoka i wahała się w granicach 55-72%.

W przypadku barwnika kationowego (MB), efektywność była niższa (31-46%), a dekoloryzacja zachodziła głównie w wyniku sorpcji przez kapsułki alginianowe, niezależnie od ich lepkości. Kandydatka wyjaśniła, że wyższa efektywność sorpcji MB wynikała z większego powinowactwa tego barwnika (kationowego) do alginianu. Wyniki te są zgodne z wcześniejszymi ustaleniami przedstawionymi w **Publikacji 4** (rysunek 3), które potwierdzają dobre właściwości sorpcyjne alginianu sodu w odniesieniu do MB.

Wyniki badań nad odbarwianiem mieszaniny barwników wykazały istotne różnice w porównaniu z wynikami dla pojedynczych barwników. Efektywność usuwania IC z mieszaniny obniżyła się o około 5-10% w porównaniu z pojedynczym barwnikiem, a proces dekoloryzacji zachodził głównie przez sorpcję. W przypadku MB, sorpcja była jedynym mechanizmem usuwania. Kandydatka nie podała jednak szczegółowego wyjaśnienia przyczyn tych różnic.

(Publikacje 5-6) Warte podkreślenia są wyniki dodatkowych badań specjalistycznych, które znacząco podniosły wartość pracy poprzez:

- potwierdzenie immobilizacji lakazy za pomocą spektroskopii Ramana (**Publikacja 5**),
- wykazanie powtarzalności parametrów geometrycznych kapsułek enzymatycznych na bazie alginianu sodu (**Publikacja 5**),
- potwierdzenie rozszczepienia grupy chromoforowej IC, będącego kluczowym etapem degradacji barwników, za pomocą analizy widm absorbcyjnych UV-VIS (**Publikacja 5**),
- porównanie toksyczności roztworów barwników i ich mieszaniny, oraz roztworów po procesie dekoloryzacji (**Publikacja 6**).

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Kandydatka sformułowała 13 obszernych wniosków z przeprowadzonych badań eksperymentalnych, które powiązała z pytaniami badawczymi, problemem badawczym oraz celem naukowym rozprawy. Wnioski zawierają istotne informacje dotyczące skuteczności

technologii immobilizacji lakazy oraz wyznaczonych warunków „*optymalnych*” dla procesu usuwania barwników (pH 3 oraz temperatura 30–40°C). Wskazano też mechanizmy dominujące w usuwaniu barwników, przy czym różne mechanizmy (sorpcja i biokataliza) odgrywały kluczową rolę w zależności od właściwości fizykochemicznych badanych barwników oraz lepkości nośnika. Ostatnie dwa wnioski sugerują, że wyniki pracy są cennym wkładem w rozwój metod oczyszczania ścieków barwnych i mogą stanowić fundament dla dalszych badań w tej dziedzinie. Jednak warto byłoby w większym stopniu podkreślić praktyczne implikacje wyników, np. w kontekście zastosowań przemysłowych.

5. Ocena oryginalności i innowacyjności

Rozprawa stanowi oryginalny i nowatorski wkład Kandydatki w rozwój wiedzy na temat procesu usuwania barwników ze ścieków oraz opracowania technologii immobilizacji lakazy na nośnikach biopolimerowych.

Do najważniejszych osiągnięć badawczych przedstawionych w rozprawie można zaliczyć:

- Opracowanie i wytworzenie kapsułek alginianowych z immobilizowaną lakazą o kulistym kształcie, wykazujących powtarzalne parametry geometryczne oraz stabilność w wyniku długoterminowego przechowywania. Wysoka skuteczność tych kapsułek została potwierdzona w odniesieniu do barwnika anionowego (IC).
- Zidentyfikowanie dominujących mechanizmów usuwania pojedynczych barwników w zależności od ich rodzaju (anionowy/kationowy) oraz w przypadku mieszaniny barwników. Rozprawa wyjaśnia, w jaki sposób różne barwniki, zarówno anionowe, jak i kationowe, są usuwane za pomocą biokatalizy i/lub sorpcji, w zależności od ich struktury chemicznej i rodzaju nośnika.
- Określenie wpływu dawki enzymu, czynników środowiskowych, takich jak pH i temperatura, oraz lepkości nośnika na efektywność usuwania pojedynczych barwników. Wyniki tych badań mogą przyczynić się do lepszej kontroli procesów technologicznych oraz poprawy efektywności procesów oczyszczania ścieków w skali technicznej.

6. Uwagi i sugestie o charakterze dyskusyjnym

Po zapoznaniu się z treścią rozprawy, nasuwają się pewne uwagi i sugestie o charakterze dyskusyjnym. Część z nich wykracza poza zakres pracy, jednak mają istotne znaczenie dla pogłębienia problematyki podjętej przez Kandydatkę. Mogą okazać się pomocne zarówno przy planowaniu dalszych badań, jak i rozwinięciu dyskusji podczas publicznej obrony rozprawy.

- Czy zebrane dane empiryczne pozwalają na wyznaczenie parametrów kinetycznych v_{\max} i K_M w równaniu Michaelisa-Menten? Jeżeli nie, jakie dodatkowe informacje lub eksperymenty byłyby potrzebne do uzyskania takich danych? Jakie metody (równania) są wykorzystywane do wyznaczania tych parametrów?

- Czy zastosowanie analizy DoE (ang. „*Design of Experiment*”) mogłoby pomóc w bardziej precyzyjnym określeniu optymalnych warunków procesu dekoloryzacji ścieków, biorąc pod uwagę czynniki środowiskowe (pH, temperatura) oraz parametry technologiczne (np. stężenie barwnika, czas reakcji)? Jakie byłyby korzyści z wprowadzenia tej metody do planowania kolejnych badań?
- Kandydatka opracowała technologię immobilizacji lakazy, jednak praktyczna aplikacja wymaga umieszczenia kapsułek z enzymem w odpowiednim reaktorze. Jakie typy reaktorów mogą być używane w tego typu procesach i czy istnieją już sprawdzone rozwiązania?
- Czy uzyskane wyniki pozwalają na przeprowadzenie analizy opłacalności (ang. „*cost-effectiveness analysis*”) lub oszacowanie wskaźników ekonomicznych, takich jak koszt wytworzenia kapsułek w przeliczeniu na jednostkę masy usuniętego barwnika? Jakie czynniki należy uwzględnić przy ocenie opłacalności tej technologii w porównaniu z alternatywnymi metodami usuwania barwników ze ścieków?
- Jakie są główne zalety i wady opracowanej technologii immobilizacji lakazy w porównaniu z innymi metodami, w tym immobilizacją na nanonośnikach? Czy występują istotne różnice w efektywności, stabilności enzymu lub kosztach produkcji?

7. Podsumowanie i wniosek końcowy

Rozprawa doktorska Pani mgr Małgorzaty Białowas pt. „*Opracowanie technologii immobilizacji lakazy na nośnikach biopolimerowych do usuwania barwników ze ścieków*” przedstawia oryginalne i nowatorskie badania nad usuwaniem barwników ze ścieków przy wykorzystaniu immobilizowanej lakazy na nośnikach biopolimerowych. Badania te znacząco przyczyniają się do rozwoju technologii oczyszczania ścieków, szczególnie w zakresie zastosowania enzymów. Do głównych osiągnięć należy opracowanie stabilnych kapsułek alginianowych, które skutecznie usuwają barwniki, oraz identyfikacja dominujących mechanizmów w zależności od rodzaju barwnika i właściwości nośnika.

Rozprawa spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim, określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2023.742). W związku z powyższym, wnioskuję o przyjęcie rozprawy przez Radę Naukową Głównego Instytutu Górnicztwa – Państwowego Instytutu Badawczego oraz dopuszczenie Pani mgr Małgorzaty Białowas do dalszych etapów postępowania kwalifikacyjnego o nadanie stopnia naukowego doktora.

J. Kępczyński