

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Małgorzaty Białowas,  
pt. **Opracowanie technologii immobilizacji lakazy na nośnikach biopolimerowych do usuwania barwników ze ścieków**

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

promotor pomocniczy: dr inż. Beata Kończak

### 1. Charakterystyka rozprawy doktorskiej

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Małgorzaty Białowas została wykonana w oparciu o materiały przesłane przez Pana Dyrektora Głównego Instytutu Górniczego – Państwowego Instytutu Badawczego, w imieniu Rady Naukowej ww. Jednostki, na podstawie ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce.

Dysertacja została zaprezentowana w formie jednotematycznego cyklu 6 wieloautorskich publikacji o łącznej wartości 870 punktów Ministerstwa Edukacji i Nauki i 9,7 punktów Impact Factor. Prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej opublikowano w latach 2019-24. Prace te, wyszczególnione poniżej, zostały omówione w formie autoreferatu o wspólnym tytule „Opracowanie technologii immobilizacji lakazy na nośnikach biopolimerowych do usuwania barwników ze ścieków”:

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.2019.05024,
2. **Deska M.**, Kończak B., 2020, Stabilność operacyjna lakaz w warunkach immobilizacji, *Przemysł Chemiczny*, 99, 472-476. DOI: 10.15199/62.2020.3.22,
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,
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,
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/aep2024149431,
6. **Białowas M.**, Kończak B., Chałupnik S., Kalka J., 2024, Analysis of feasibility of using biopolymers of different viscosities as immobilization carriers for laccase in synthetic dye removal. *Archives of Environmental Protection*, 50, 1, 19-34. DOI: 10.24425/aep.2024.149429.

Przegląd literaturowy, stanowiący podstawę publikacji 1-3 oraz wyniki i dyskusja pozostałych z wymienionych powyżej prac, wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, zostały omówione w autoreferacie, opatrzonym wspólnym streszczeniem, wprowadzeniem, celem pracy, przeglądem literaturowym, dotyczącym tematu rozprawy, metodami i materiałami badawczymi, opisem wyników wraz z dyskusją, podsumowaniem i wnioskami oraz wskazaniem perspektywy dalszych badań.



Wkład autorski Pani mgr Białowąs w powstanie ww. prac wynosił od 74% do 80%. We wszystkich pracach po jej stronie leżało przygotowanie koncepcji i zaprojektowanie badań, zebranie i analiza danych oraz napisanie artykułu i przeprowadzenie go przez proces recenzji, zakończony publikacją. Można więc stwierdzić, że Doktorantka w trakcie przygotowywania publikacji do rozprawy doktorskiej nabyła wiedzę i umiejętności w planowaniu, realizacji oraz publikacji badań naukowych.

Głównym celem rozprawy doktorskiej była analiza możliwości zastosowania biopolimerów o różnej lepkości jako nośników do immobilizacji lakazy. Cel ten wynikał z szerszego kontekstu konieczności efektywnego usuwania mikrozanieczyszczeń, jakimi są barwniki syntetyczne, ze ścieków. Związki te, powszechnie obecne w wodzie i glebie, stanowią poważne zagrożenie środowiskowe. Mając na uwadze zaostrzające się aktualnie regulacje prawne, dotyczące usuwania mikrozanieczyszczeń, w tym barwników, ze ścieków, temat pracy jest uzasadniony. Pomimo faktu, że użycie lakazy do procesów usuwania ww. związków nie jest tematem nowym i w ostatnich 20 latach obserwuje się rosnącą liczbę publikacji w tym temacie, taki trend publikacyjny wskazuje, że jest to nadal ważne i aktualne zagadnienie naukowe i technologiczne. Doktorantka po przeprowadzeniu przeglądu literaturowego, który zaowocował publikacjami 1-3, znalazła lukę w badaniach w tym zakresie, wskazując na lepkość jako czynnik, który może być odpowiedzialny za efektywność usuwania barwników ze ścieków z użyciem lakazy immobilizowanej w nośnikach biopolimerowych. Pozwoliło to na przygotowanie rozprawy doktorskiej z elementem nowości naukowej, pomimo, iż wskazany przez Doktorantkę cel użyteczny, czyli ocena możliwości usuwania barwników ze ścieków poprzez zastosowanie technologii immobilizacji lakazy na nośnikach biopolimerowych, choć ważny, jest stosunkowo dobrze poznanym zagadnieniem. Warto zwrócić uwagę, że Doktorantka umiejętnie zadała kilka ważnych z punktu widzenia jej pracy pytań (s. 22) oraz wskazała kolejne kroki realizowanych w pracy badań. Postawiła również hipotezę badawczą, do której odniosła się w podsumowaniu rozprawy. W moim odczuciu tak zapisana hipoteza jest jednak już zweryfikowana (np. Ping et al., 2008, [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)62559-0](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62559-0); Mogharabi et al., 2012, 10.1155/2012/823830; Thakur et al., 2018, DOI:10.19080/AIBM.2018.11.555813) i dla tej pracy powinna zostać zmodyfikowana w kontekście lepkości nośnika alginianowego, będącego elementem nowości naukowej.

Pomimo faktu, że Doktorantka przygotowała w autoreferacie przegląd literaturowy, stanowiący podstawę do wskazania wyznaczonych w rozprawie celów badań oraz hipotezy badawczej, brakuje pewnej płynności w opisach kolejnych elementów tej części pracy. Być może wynika to z faktu, że we wstępie Doktorantka odnosi się osobno do każdej z publikacji wchodzącej w skład rozprawy, co powoduje kilkukrotne odniesienie się do tych samych zagadnień w różnych miejscach autoreferatu. Autoreferat ma za zadanie uporządkować przeprowadzone i opublikowane badania, a jego wstęp teoretyczny ma wprowadzić w jednym miejscu zagadnienia niezbędne do zrozumienia i oceny całości pracy Doktorantki. Ułatwia to poruszanie się po dalszej części tekstu oraz zrozumienie założeń pracy, jej realizacji oraz weryfikację spełnienia celów badawczych. Pomimo takiej technicznej usterki, merytorycznie nie mam zastrzeżeń do przedstawionych w tej części autoreferatu treści.

W trakcie czytania pracy napotkałam na kilka zagadnień, które mogą stanowić punkt wyjścia do dalszej dyskusji:

- Jakie przesłanki skłoniły Doktorantkę do podjęcia badań nad wpływem takiego parametru, jak lepkość alginianów, na efektywność zastosowania ich jako substancji immobilizujących enzymy, usuwające barwniki syntetyczne?
- Doktorantka wymiennie stosuje pojęcia dekoloryzacja, usuwanie i (bio)degradacja. Chciałabym prosić o wyjaśnienie tych pojęć i wskazanie, które z nich najtrafniej odnosi się do zakresu tej pracy.
- Tytuł pracy mówi, że ta dysertacja to opracowanie technologii. Na stronie 20 autoreferatu napisano natomiast że „Pozyskana nowa wiedza w tym zakresie przyczyni się do rozwoju technologii immobilizacji enzymów do potencjalnego zastosowania w technologiach oczyszczania ścieków barwnych”. Zakładając zgodnie z tytułem dysertacji oraz punktem 12 w sekcji: Podsumowanie i wnioski, że zrealizowana praca doktorska to opracowana technologia, którą można użyć w procesie usuwania barwników ze ścieków, chciałabym prosić o klarowne przedstawienie zasady działania tej technologii oraz wskazanie przedstawienie kolejnych etapów jej użycia dla ścieków zawierających barwniki syntetyczne w oczyszczalni ścieków. Czy Doktorantka zastanawiała się również nad opłacalnością takiego rozwiązania oraz skalowalnością jej badań do skali technicznej? Jakie są perspektywy i możliwości wdrożenia tej technologii w skali technicznej?
- W dysertacji prowadzono badania na modelowych barwnikach – indygo karminie i błękitie metylenowym. Z czego wynikało użycie tych konkretnych barwników?

- Na stronie 18 Doktorantka wspomina o monitorowaniu mikrozanieczyszczeń, jakimi są barwniki syntetyczne. Proszę wskazać przykładowe metody analityczne/narzędzia, które można wykorzystać do takiego monitoringu w środowisku wodnym.
- Na stronie 24 wspomniano, że większość enzymów nie może być stosowanych w procesach przemysłowych ze względu na „ekstremalne warunki” tam panujące. Jakie warunki Doktorantka ma na myśli i czy w związku z tym nie należałoby wziąć pod uwagę enzymów, które są stabilne w warunkach skrajnego pH, temperatury itd. – np. enzymów *Archaea*?
- Na stronie 25 wspomniano, że „Zmodyfikowane właściwości enzymu, poprzez jego unieruchomienie, czynią go bardziej stabilnym i odpornym na warunki środowiska”. Również na stronie 27 wskazano, że „technologia immobilizacji enzymów oferuje możliwość korzystnej modyfikacji właściwości katalitycznych i fizykochemicznych enzymów do zastosowań w ciągłych procesach na skalę przemysłową”. Jakie właściwości enzymu ulegają modyfikacji w procesie immobilizacji i czy zawsze są to te same właściwości niezależnie od enzymu i substancji immobilizującej?
- Na stronie 28 Doktorantka pisze, że „immobilizacja enzymu prowadzi do zwiększenia jego stabilności poprzez wielopunktowe oddziaływanie z powierzchnią nośnika, stwarza korzystne mikrośrodowisko...” Czy w procesie immobilizacji chodzi o zmianę w enzymie czy tylko o stworzenie odpowiednich warunków procesu wewnątrz immobilizatu? Czy to oznacza, że enzym nieimmobilizowany jest niestabilny strukturalnie?
- Na rysunku 1 (s. 26) przedstawiono schematy reakcji katalizy prowadzonej przez lakazę. W szczególności rysunek dotyczący procesu typu B budzi moją wątpliwość (być może to kwestia nieprecyzyjnych opisów). Proszę o doprecyzowanie i szersze wyjaśnienie mechanizmów reakcji widocznych na rysunku.
- Na czym polegają procesy elektrospiniwania i druku 3D w immobilizacji?
- Doktorantka wybrała do badań dwa biopolimery, które mogą być stosunkowo łatwo biodegradowalne przez zbiorowiska mikroorganizmów środowiskowych, w tym osadu czynnego czy gleby (Phang et al., 2011, <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2011.06.010>; Ma et al., 2024, <https://doi.org/10.1016/j.jece.2024.112178>; Li et al., 2021, DOI: Sun et al., 2022, 10.3390/md20040254) Kaczmarek-Szczepańska et al., 2021, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.133>; Sawaguchi et al., 2014, <https://doi.org/10.1080/00380768.2014.1003965>). Czy zdaniem Doktorantki te nośniki sprawdzą się w wielokrotnym użyciu w biologicznych oczyszczalniach ścieków? Czy można je jakoś zabezpieczyć przed biodegradacją w takich procesach?
- W metodyce wykazano, że badania efektywności pracy lakazy prowadzono w pH 3, 5 i 7, wskazując wartość 7 jako „wysoką”. Podobnie w kwestii temperatury – badania prowadzono w 30 i 40°C. Mając na uwadze charakterystykę ścieków komunalnych, których pH jest właśnie taką „wysoką” wartością, a temperatury rzadko osiągają testowaną w eksperymencie wartość, jaka (i czy w ogóle) jest możliwość efektywnego stosowania takich immobilizowanych enzymów w komunalnej oczyszczalni ścieków?
- W metodyce (s. 37) badano parametr kolistości czy kulistości?
- Na stronie 42 Doktorantka wskazuje, że mniejsze powinowactwo (enzymu) wiąże się z dłuższym czasem jego działania. Z czego to wynika? I dlaczego przekłada się to na stabilniejszą pracę bioreaktorów?
- Immobilizaty badane w tej pracy testowano pod kątem zachowania aktywności enzymatycznej z użyciem procesu powolnego suszenia (5 h, 30°C). Z czego wynika tak dobrany czas i temperatura procesu? Ponadto wykazano (s. 47), że wysuszone kapsułki miały blisko dwukrotnie większą aktywność enzymatyczną. Oznaczałoby to, że immobilizowany enzym lepiej sobie radzi „na sucho”, niż w formie uwodnionej. Jak taka zmiana efektywności ma się do ich późniejszego użycia w zawiesinie ścieków?
- Doktorantka w swoich badaniach identyfikowała dominujący mechanizm dekoloryzacji barwników w zależności od warunków procesu i typu barwnika. Proszę przybliżyć poszczególne etapy procedury badawczej, które pozwoliły dojść do wskazania (dominującego lub jedyne) procesu odpowiedzialnego za rozkład barwników.
- W dysertacji wykazano, że efektywność procesu degradacji barwników zależy szeregu czynników fizykochemicznych zarówno środowiska procesu, substancji immobilizujących, jak i samych barwników. Ponadto, mechanizmy usuwania mieszaniny barwników są odmienne, niż te w procesie usuwania pojedynczych barwników,

co może mieć niebagatelny wpływ na tworzenie technologii do usuwania tych związków ze ścieków. Czy w opinii Doktorantki jest możliwość stworzenia takiej technologii, która będzie pozwalała na usuwanie szerokiego wachlarza barwników z użyciem jednego enzymu i jednej substancji immobilizującej? Jeśli tak, jaka cecha tych barwników byłaby tu najbardziej znacząca w kontekście ich usuwania ze ścieków?

- W jaki sposób wyniki testów toksyczności wskazują na mechanizmy usuwania barwników z mieszaniny (wniosek 8)?

## 2. Ocena zasadności podjętej tematyki badawczej

Problem naukowy, którego rozwiązania podjęła się w recenzowanej rozprawie Pani mgr Małgorzata Białowas dotyczy opracowania technologii immobilizacji lakazy na nośnikach biopolimerowych do usuwania barwników ze ścieków. Zagadnienie to związane jest z usuwaniem mikrozanieczyszczeń w postaci barwników syntetycznych ze ścieków tzw. zielonymi, przyjaznymi środowisku metodami. Tematyka wpisuje się w aktualne trendy rozwoju ochrony i inżynierii środowiska. Co więcej, w kontekście planowanych zmian legislacyjnych, dotyczących obecności w ściekach mikrozanieczyszczeń i ich usuwania w procesach oczyszczania temat efektywnego usuwania barwników jest ważny z praktycznego i ekonomicznego punktu widzenia, jak wskazano słusznie w celu utylitarnym doktoratu. Dlatego też zasadność przyjętej tematyki badawczej oceniam pozytywnie.

## 3. Osiągnięcia pracy

Badania dotyczy opracowania technologii immobilizacji lakazy na nośnikach biopolimerowych do usuwania barwników ze ścieków to temat ważny i aktualny. Rozprawa doktorska Pani mgr Małgorzaty Białowas to rzetelna analiza teoretyczna i praktyczna, pozwalająca przygotować techniczne założenia do stworzenia efektywnej technologii usuwania ww. mikrozanieczyszczeń ze ścieków. Za osiągnięcie w tej dysertacji uznaję uzupełnienie wiedzy w zakresie immobilizacji lakazy za pomocą alginianu o różnej lepkości oraz wpływu tej cechy nośnika na efektywność procesu usuwania barwników syntetycznych. Niewątpliwym walorem pracy jest przeprowadzenie badań laboratoryjnych, stanowiących punkt wyjścia dla przygotowania technologii usuwania barwników syntetycznych ze ścieków z użyciem immobilizowanej lakazy. Ponadto, Doktorantka przeprowadziła badania dotyczące aspektu ekotoksyczności barwników i ich metabolitów w środowisku wodnym po procesie ich degradacji oraz zbadała zmiany jakie zachodzą w immobilizatach w procesie przechowywania. Te analizy uzupełniają wiedzę w zakresie potencjalnego wpływu ścieków oczyszczonych proponowaną metodą na odbiorniki oraz wskazują możliwości rozwoju technologii immobilizacji jako ekonomicznej metody z wielokrotnym użytkowaniem stosowanych enzymów.

## 4. Podsumowanie pracy

Doktorantka przedstawiła do oceny cykl 6 jednotematycznych publikacji naukowych. Prace te są wynikiem przeglądu literaturowego i badań laboratoryjnych, tworzących spójną całość i spełniających wykazane na początku pracy cele badawcze. W autoreferacie Doktorantka nie ustrzegła się drobnych błędów językowych, interpunkcyjnych i edycyjnych, które jednak w żaden sposób nie umniejszają merytorycznej stronie pracy i z reguły są nieuniknione.

W oparciu o przeprowadzone badania Doktorantka sformułowała szereg wniosków, z których w moim odczuciu najważniejszymi są:

- Możliwe jest usunięcie barwników błękitu metylenowego i indygo karminu oraz ich mieszaniny przy użyciu immobilizowanej lakazy na alginianie sodu o różnej lepkości, jednak proces zachodzi na drodze odmiennych mechanizmów i z różną skutecznością.
- Niezależnie od lepkości alginianu, dekoloryzacja indygo karminu zachodziła głównie na drodze biokatalizy. Podczas dekoloryzacji błękitu metylenowego dominował proces sorpcji.

## 5. Konkluzja końcowa

Przedstawiona do oceny dysertacja potwierdza umiejętności Doktorantki w zakresie planowania i realizacji badań naukowych oraz ich opracowania, podsumowywania i publikowania w czasopismach naukowych. W moim odczuciu rozprawa doktorska jest merytoryczna i wskazuje na możliwość praktycznego zastosowania uzyskanych w niej wyników w inżynierii środowiska. Nie mam wątpliwości, że rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Białowas pt. Opracowanie technologii immobilizacji lakazy na nośnikach biopolimerowych do usuwania barwników ze ścieków spełnia warunki wskazane w art 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce. Wnoszę więc o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim w Głównym Instytucie Górnictwa – Państwowym Instytucie Badawczym.

A. Ciemiela-Buczyńska