



UNIwersYTET
WARMIŃSKO-MAZURSKI W OLSZTYNIE

WYDZIAŁ GEOINŻYNIERII

INSTYTUT INŻYNIERII I OCHRONY ŚRODOWISKA

KATEDRA BIOTECHNOLOGII W OCHRONIE ŚRODOWISKA

prof. dr hab. inż. Agnieszka Cydzik-Kwiatkowska

Olsztyn, 26 sierpnia 2024 r.

Tel. 895234194

e-mail: agnieszka.cydzik@uwm.edu.pl

RECENZJA

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

1. Podstawa formalna recenzji

Recenzja została sporządzona na zlecenie Rady Naukowej Głównego Instytutu Górniczego – Państwowego Instytutu Badawczego (pismo NOP/163/2024/R).

2. Uzasadnienie celowości badań

Mikrozanieczyszczenia, w tym barwniki, są ważnym problemem środowiskowym. Barwniki i ich metabolity mogą być toksyczne i ulegać bioakumulacji w organizmach żywych, pogarszają jakość wody, jak też negatywnie wpływają na kluczowy dla roślin proces fotosyntezy. Obiecującym rozwiązaniem w oczyszczaniu ścieków jest zastosowanie biokatalizy opartej o wykorzystanie enzymów o niskiej specyficzności substratowej izolowanych głównie z grzybów, które mogą rozkładać barwniki do związków łatwiej biodegradowalnych. Jednym z takich enzymów jest lakaza. Poprawę stabilności procesu oczyszczania ścieków barwnych można uzyskać przez unieruchomienie enzymu w biopolimerowej matrycy, co chroni go przed niekorzystnymi zmianami warunków środowiskowych oraz ułatwia oddzielenie enzymu od ścieków po procesie oczyszczania i ponowne użycie biokatalizatora. Dla przebiegu procesu ważne jest usieciowanie nośnika, decydujące o efektywności usuwania barwników. Celem badań było określenie zasadności stosowania biopolimerów (alginianu sodu o różnej lepkości oraz chitozanu) jako nośników do immobilizacji lakazy do dekoloryzacji indygo karminu, błękitu metylenowego oraz ich mieszaniny, w tym optymalizacja warunków procesu, określenie mechanizmów usuwania poszczególnych barwników oraz ocena toksyczności próbek poprocesowych. Temat rozprawy

doktorskiej został wybrany trafnie. Przeprowadzone badania wpisują się w dyscyplinę inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka, poszerzając wiedzę dotyczącą wpływu właściwości polimerów wykorzystanych do immobilizacji lakazy na efektywność usuwania barwników ze ścieków.

3. Ocena pracy

Zgodnie z przepisami określonymi ustawą z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, rozprawa doktorska ma formę jednotematycznego cyklu 6 wieloautorskich publikacji pod wspólnym tytułem „Opracowanie technologii immobilizacji lakazy na nośnikach biopolimerowych do usuwania barwników ze ścieków”. Cykl publikacji obejmuje prace:

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. Białowąs, 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. Białowąs, 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)

Prace opublikowano w latach 2019-2024. Udziału procentowy Doktorantki w przygotowaniu prac stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej waha się od 70 do 80% i wskazuje na wiodącą rolę w prowadzeniu badań. Doktorantka opracowywała koncepcje

badań, zbierała i analizowała dane, interpretowała wyniki oraz przygotowywała pierwsze wersje artykułów. Wszystkie przedstawione prace są indeksowane w Web of Science i posiadają Impact Factor (IF). Sumaryczna wartość IF przedstawionych prac, zgodnie z rokiem ukazania, wynosi 9,7.

Cykl prac badawczych został poprzedzony opisem obejmującym:

- Streszczenie/Summary
- Wykaz publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej
- Wprowadzenie
- Cel pracy i koncepcja badań
- Przegląd literatury dotyczący tematu rozprawy
- Materiały i metody badawcze
- Wyniki badań i dyskusję
- Perspektywy dalszych badań
- Podsumowanie i wnioski
- Literaturę
- Spis rysunków
- Spis tabel
- Załączniki (informacje o dorobku wspierającym, oświadczenia współautorów o udziale procentowym w przygotowaniu publikacji oraz publikacje będące podstawą pracy doktorskiej).

W Rozdziale „Cel pracy i koncepcja badań” Doktorantka nie tylko zaprezentowała cel badań i uzasadnienie ich podjęcia poparte danymi literaturowymi, ale również podkreśliła elementy nowości badań, jasno sprecyzowała pytania badawcze oraz zaprezentowała plan pracy, co bardzo dobrze przygotowuje czytelnika do oceny uzyskanych wyników.

Trzy pierwsze prace w ramach cyklu publikacji to prace przeglądowe. W pierwszym z artykułów Doktorantka skupiła się na możliwości wykorzystania lakazy grzybowej o niskiej specyficzności substratowej i zdolności rozkładu wielu rodzajów zanieczyszczeń jako „zielonego katalizatora” w procesie dekoloryzacji. Dokonała przeglądu nośników i technik stosowanych do immobilizacji lakazy w celu zwiększenia jej stabilności operacyjnej oraz zaprezentowała wyniki badań nad dekoloryzacją barwników z wykorzystaniem

immobilizowanej lakazy. W drugiej z prac przeglądowych skupiła się na immobilizacji jako technice zwiększającej stabilność operacyjną lakazy przez utrzymanie wysokiej aktywności enzymu w szerszym zakresie pH i temperatury oraz umożliwiającej odzysk biokatalizatora z mieszaniny poprocesowej. Ostatnia z prac przeglądowych prezentuje nośniki, jakie mogą być wykorzystane w procesie immobilizacji, wskazując w szczególności na alginian sodu oraz chitozan jako substancje biodegradowalne, nietoksyczne oraz biokompatybilne. Dodatkowo zaprezentowane są główne metody immobilizacji enzymów. Prace przeglądowe wskazują na bardzo dobre przygotowanie merytoryczne Doktorantki do podjęcia prac badawczych zaplanowanych w doktoracie.

Celem badań przedstawionych w publikacji 4 było opracowanie kapsułek enzymatycznych do potencjalnego zastosowania w usuwaniu barwników ze ścieków, w tym dobór rodzaju nośnika i jego stężenia, oraz stężenia i metody immobilizacji lakazy. Najwyższą aktywność enzymatyczną posiadał enzym immobilizowany na nośniku alginianowo-chitozanowym, jednak kapsułki enzymatyczne na bazie tego nośnika charakteryzowały się niską odpornością mechaniczną. Spośród badanych technik immobilizacji najlepsze rezultaty uzyskano stosując wkraplanie 2% alginianu sodu. Immobilizacja wydłużyła czas działania enzymu w porównaniu do jego wolnej formy oraz chroniła enzym przed wysokim pH środowiska. W kontekście praktycznego wykorzystania kapsułkowanych enzymów, wskazano przechowywanie w 4°C bez dostępu wody oraz suszenie niskotemperaturowe jako rozwiązania utrzymujące wysoką aktywność biopreparatów.

W publikacji 5 prowadzono badania nad wykorzystaniem lakazy z *Trametes versicolor* immobilizowanej na nośniku z alginianu sodu do usuwania anionowego indygo karminu. Scharakteryzowano geometrię kapsułek bez i z immobilizowanym enzymem oraz jej zmiany w czasie oraz wskazano optymalną temperaturę dekoloryzacji (30-40°C). Zastosowanie immobilizowanej lakazy w dawce 320 mg/mg barwnika umożliwiło ponad 90% usunięcie indygo karminu w ciągu 40 dni, głównie w wyniku biokatalizy. Aktywność lakazy powodowała rozszczepienie grupy chromoforowej indygo karminu i wytworzenie produktów bardziej podatnych na biodegradację.

W publikacji 6 Doktorantka wykazała, że rodzaj barwników obecnych w ściekach (kationowe, anionowe, mieszanina barwników) determinuje mechanizm i skuteczność ich usuwania przez lakazę immobilizowaną na alginianie sodu. Niezależnie od lepkości alginianu wykorzystanego do immobilizacji lakazy, usunięcie indygo karminu zachodziło głównie na drodze biokatalizy, podczas gdy usunięcie błękitu metylenowego następowało głównie

w wyniku sorpcji. Najwyższą efektywność dekoloryzacji błękitu metylenowego (45,80%) uzyskano stosując kapsułki na bazie alginianu o wysokiej lepkości, co prowadziło do dekoloryzacji zarówno na drodze biokatalizy, jak i sorpcji, a w rezultacie obniżenia toksyczności próbek poprocesowych. Zastosowanie kapsułek na bazie alginianu o najniższej lepkości skutkowało dekoloryzacją błękitu metylenowego wyłącznie na drodze sorpcji; zwiększanie lepkości alginianu zwiększało udział biokatalizy w dekoloryzacji. Wykazano, że wyniki testów odbarwiania mieszanin barwników różnią się od wyników uzyskanych dla pojedynczych barwników. Usunięcie indygo karminu z mieszaniny barwników nastąpiło głównie na drodze sorpcji, przy czym zastosowanie kapsułek 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 kapsułek na bazie alginianów o średniej i niskiej lepkości. Dekoloryzacja błękitu metylenowego w mieszaninie nastąpiła wyłącznie na drodze sorpcji, niezależnie od lepkości użytego alginianu.

W rozdziale Podsumowanie i Wnioski Doktorantka punkt po punkcie odniosła się do postawionych w rozdziale 3 pytań badawczych, celu badań, problemu badawczego oraz hipotezy badawczej.

W związku z przeprowadzonymi badaniami nasuwa mi się kilka zagadnień, które chcę poddać dyskusji:

1. W publikacji 4 Doktorantka stwierdza, że „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. W przypadku 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”. Proszę wyjaśnić różnice we wpływie struktury nośnika na sorpcję barwnika w zależności od zastosowanego nośnika.
2. W badaniach stosowano stężenia indygo karminu i błękitu metylenowego na poziomie 5 mg/L oraz ich mieszaninę o stosunku molowym MB/IC równym 0,69. Na ile te wartości pokrywają się z wartościami obserwowanymi w przypadku rzeczywistych ścieków barwnych?
3. Przy tworzeniu kapsułek alginianowych z immobilizowaną lakazą wykorzystywano roztwór lakazy w wodzie destylowanej lub buforze. Od czego zależał wybór buforu lub wody?
4. W rozdziale 7 przedstawiono perspektywy dalszych badań nakierowanych na rozwój technologii usuwania barwników ze ścieków przy wykorzystaniu immobilizowanych

enzymów. Czego, zdaniem Doktorantki, należy się spodziewać jeśli chodzi o wydajność procesu w kolejnych cyklach dekoloryzacji, w szczególności w wypadku barwników, których usuwanie jest oparte głównie na sorpcji?

5. Czy były podejmowane badania z wykorzystaniem rzeczywistych ścieków barwnych? Z jakimi wyzwaniami, zdaniem Doktorantki, trzeba się będzie w takim wypadku zmierzyć?

Uwagi szczegółowe

- W pracy przygotowano zestaw zastosowanych skrótów, jednak odbiór skrótów często nie jest jednoznaczny. Dla przykładu, lakaza raz jest oznaczana literą „e” od słowa enzym, a raz literą „L” (np. w skrócie AL-Ch-L). Litera „L” jest również wykorzystana jako symbol długości.

- Język polski powinien być konsekwentnie stosowany w całym opisie – rysunki są jednak opisane w języku angielskim.

- Str. 27 - powinno być „zielone narzędzie”.

- Str. 33 – dlaczego w tabeli „brak danych” dotyczących lepkości dla kwasu alginowego o wysokiej lepkości oraz pH dla AL-LV?

- Str. 35 – styl, z pierwszego zdania czwartego paragrafu wynika, jakby woda destylowana miała stężenie 1-3%.

- Str. 38 – powinno być 1-minutowych.

- Str. 37 – „w zakresie pH 3, 5, 7” – nie mamy do czynienia z zakresem, a z konkretnymi wartościami pH.

- W pracy brakuje konsekwencji w stosowaniu jednostki lepkości (cps str. 33 i mm²/s str. 40).

- Str. 41, Rys. 3 – legenda objaśnia tylko to, co widać na zdjęciach 1a-1d, pozostałym pięciu zdjęciom brakuje opisu.

- Str. 52 – przy podawaniu wartości średniej (np. średniej długości kapsulek) powinna być też podana wartość odchylenia standardowego.

- Na Rys. 10 – jednostka % usunięcia jest podana zarówno w opisie osi, jak i na osi – jedną z jednostek należy usunąć.

- Str. 57 – nazwy rodzajowe organizmów piszemy pochyłą czcionką (np. *Ganoderma*).

- W legendach rysunków należy podawać z ilu powtórzeń liczono prezentowane na wykresach średnie wartości i odchylenia standardowe.

- w opisie znajduje się fragment „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”. Czy w wypadku kapsułek bez immobilizowanego enzymu należało się spodziewać aktywności enzymatycznej?

4. Podsumowanie

Celem pracy doktorskiej było zbadanie możliwości wykorzystania biopolimerów o różnej lepkości jako nośników do immobilizacji lakazy. Praca jest napisana poprawnym językiem, stosowana terminologia nie budzi zastrzeżeń. Doktorantka prawidłowo formułuje pytania badawcze, rzetelnie opisuje i dyskutuje otrzymane wyniki, jak również wyciąga poprawne wnioski. Wyniki początkowych eksperymentów są inspiracją do kolejnych badań, co powoduje, że całość pracy układa się w logiczny ciąg podejmowanych tematów badawczych.

Nowatorski aspekt badań polegał na ocenie wpływu lepkości alginianów jako nośników do immobilizacji lakazy w procesie usuwania barwników (błękit metylenowy, indygo karmin i ich mieszanina) wraz z określeniem mechanizmów ich usuwania, oceną skuteczności dekoloryzacji w zależności od warunków procesu wraz badaniami toksyczności próbek poprocesowych. Uzyskane w pracy wyniki mają aspekt praktyczny wskazując wymagane warunki przechowywania preparatów enzymatycznych oraz parametry procesu usuwania barwników barwników ze ścieków z wykorzystaniem immobilizowanych enzymów.

Do najważniejszych osiągnięć doktoratu zaliczam:

- określenie skuteczności usuwania indygo karminu, błękitu metylenowego i ich mieszaniny przy użyciu lakazy immobilizowanej na nośniku biopolimerowym o różnej lepkości,
- określenie wpływu pH i temperatury na dekoloryzację przy użyciu wolnych i immobilizowanych lakaz,
- określenie geometrii kapsułek z immobilizowaną lakazą oraz wpływu suszenia na jej zmiany,
- określenie roli sorpcji i biokatalizy podczas dekoloryzacji indygo karminu, błękitu metylenowego i ich mieszaniny przy użyciu kapsułek alginianowych,

- określenie wpływu dekoloryzacji przy użyciu lakazy immobilizowanej na bazie alginianu sodu na toksyczność próbek poprocesowych,
- wskazanie optymalnych warunków przechowywania preparatów enzymatycznych umożliwiające utrzymanie ich wysokiej aktywności.

Doktorantka może się pochwalić dodatkowym dorobkiem obejmującym autorstwo jednej i współautorstwo dziesięciu publikacji, współautorstwo dwóch rozdziałów w monografiach oraz udział w konferencji naukowej. Na uznanie zasługuje fakt, że jest również współautorką dwóch patentów, co na tym etapie kariery naukowej jest dużym osiągnięciem. Doktorantka kierowała czterema zdaniami badawczymi, finansowanymi ze środków statutowych, a obejmującymi tematykę doktoratu. Wraz z zespołem uzyskała Złoty Medal przyznany przez Jury Konkursowe XIV Wirtualnej Międzynarodowej Warszawskiej Wystawy Wynalazków „IWIS 2020” za „Technologię otrzymywania nawozu organicznego z ustabilizowanych osadów ściekowych”. Dorobek doktorantki wskazuje na jej dużą aktywność badawczą i przygotowanie do pracy naukowej.

5. Wniosek końcowy

Przedstawiona dysertacja ma wysoki poziom merytoryczny, jest spójna tematycznie i wskazuje na umiejętność samodzielnej realizacji badań naukowych przez Doktorantkę. Praca wpisuje się w tematykę badawczą w dyscyplinie inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka, a uzyskane wyniki mają duży potencjał aplikacyjny. Oceniana rozprawa mgr Małgorzaty Białowas spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim określone Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Wniosuję o dopuszczenie rozprawy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Agnieszka Cydul-Kucielnikowska