



Odborný posudek doktorské dizertační práce Mgr. Mileny Maryškové

Enzymatically activated filters for water treatment

Předkládaná práce jak v úvodu, tak i v teoretické části popisuje některé teoretické a zejména experimentální aspekty přípravy, charakterizace enzymaticky aktivních filtrů a jejich využití pro čištění odpadních vod. Hlavní cíle práce byly stručně vymezeny již v úvodní kapitole. Zvolené téma velice dobře reaguje na současný stav a trendy v oboru biotechnologických procesů a jejich využití při úpravě odpadních vod.

Práce je psána v anglickém jazyce, přehledně členěna a je doplněna 268 odkazy na odborné články. Kompilační část práce působí kompaktním dojmem a je velice čtivá. Text edukativním způsobem čtenáře seznamuje s dílčími kroky, jak získat enzymaticky aktivní materiál vhodný pro filtraci odpadních vod s cílem zbavit je vybraných toxických organických látek. Některé informace uvedené v teoretické části práce jsou nové a přínosné, ale v 16 stranách teoretické části převažuje text shrnující základní přehled a učebnicové informace. Je škoda, že autorka text neobohatila o pasáže komentující aktuální stav řešené problematiky, současné trendy a směry výzkumu a vývoje.

V experimentální části autorka prokázala schopnost prakticky využívat širokého spektra metodik napříč obory enzymologie, biochemie, analytické chemie, biotechnologie, nanotechnologie. Témata jako je izolace a imobilizace enzymu lakázy na různé typy nanovláknenných nosičů jsou pečlivě a přehledně popsána a logicky vedou jednotlivými kroky přípravy bioaktivního nosiče na bázi organických nanovláken. Výsledky jsou vždy doplněny o graf mapující účinnost degradace pro jednotlivé organické látky a komentovány v kontextu jiných odborných prací věnujících se podobné problematice. Velice kladně lze hodnotit i fakt, že práce obsahuje kapitolu popisující návrhy, jak uplatnit tyto katalytické systémy v praxi. Konkrétně se jedná o tři konstrukčně rozdílné formy: nanovláknenné membrány, nanovláknenné disky a reaktor s 3D nanovláknennou strukturou.

V další části posudku uvedu pouze drobné připomínky k textu práce:

1. V přehledu látek, které se používají ke stanovení aktivity lakázy chybí souhrn výhod a nevýhod zvolených metod a chybí informace o citlivosti a rozsahu každé z daných metod (str. 39 – 41).
2. Na straně 43 dole je u „SPME fiber“ v závorce uvedeno (100 μ m polydimethylsiloxane) – může autorka svými slovy popsat princip mikroextrakce a proč byl k extrakci použit právě tento materiál?
3. Na straně 44 autorka popisuje metodu identifikace a rozdělení degradačních produktů reakce katalyzované lakázou. Jedná se o metodu HPLC, kde byla použita kolona „Phenomenex

Kinetex F5 core-shell". Můj dotaz zní, prováděla tyto separace autorka sama nebo tento krok byl proveden ve spolupráci s jiným pracovištěm? Na základě jakého separačního principu byly degradační produkty rozděleny?

4. Jak si autorka vysvětluje rozdílnou aktivitu enzymu HRP měřenou pomocí ABTS (obr. 27, str. 54) ve srovnání s dalšími dvěma substráty?
5. V experimentální části, kapitola 11 a 12, prosím o vysvětlení, proč byly experimenty proměřovány pouze na tři katalytické cykly. Dále u popisu metod autorka uvádí, že vzorky byly proměřovány pouze v duplikátech. Byl k tomu nějaký konkrétní důvod? Pro vyhodnocení výsledků průměrnou hodnotnou s uvedením směrodatné odchylky je žádoucí provádět měření min. ve třech opakováních.

Poznámky k formální stránce textu dizertační práce:

1. Autorka nezvykle zařadila do seznamu zkratk i chemické vzorce látek.
2. V abstraktu je pravděpodobně překlep v názvu látky ethinylestradiol.
3. Nejednotné psaní čísel – v jednom odstavci je one U x 1 U, one μmol (str. 39).
4. V kapitole 4.1 a 4.2 není vhodné psát některé látky a materiály zvýrazněnou formou.
5. V přehledu chemikálií u názvy firmy chybí sídlo firmy a stát, odkud firma pochází.

Na závěr bych měla na dizertantku některé dotazy a náměty k diskuzi týkající se předložené problematiky. Prosím o stručné odpovědi.

1. Na str. 26 autorka zmiňuje 3 optimální kandidátní enzymy (lakáza, peroxidáza, tyrozináza) pro použití k imobilizaci a čištění odpadních vod. Opravdu jsou dnes v praxi používány nebo v rámci výzkumu vyvíjeny systémy s enzymy pouze těchto tří skupin? Existují ještě další enzymy, které se testují, zda by byly pro tyto účely vhodné a proč?
2. Výsledky v kapitole 11 naznačují, že enzym křenová peroxidáza má lepší katalytické vlastnosti ve vzorcích přírodních a odpadních vod (pH 6 – 8,1) než enzym lakáza (obr. 31, 33, 35). Prosím o vysvětlení, proč byl pro další experimentální práci vybrán enzym lakáza. Byl důvodem pouze požadavek přídavku H_2O_2 , jak je naznačeno v závěru, nebo byly další faktory, které o výběru rozhodly?
3. V kapitole 4.2. na str. 28 autorka popisuje enzym lakázu izolovanou z různých zdrojů a vázanou na různé typy nosičů za účelem použití k degradaci organických látek ve vodě. Převažují práce z let 2003 – 2016, jedna práce je z roku 2018. Existují nové práce na podobné téma publikované v roce 2019 – 2020? Je tato problematika nadále intenzivně studována a rozvíjena, nebo dochází opravdu k útlumu, jak naznačuje výčet literárních odkazů? Jak je to s uplatněním podobných systémů v praxi? Bylo by možné také zhodnotit, které z těchto systémů se v současné době ukazují jako vhodné pro praxi. Existují informace o tom, že ačkoliv v laboratorních podmínkách systém fungoval, tak v praxi se systém neosvědčil?

Prosím i o kritické srovnání jejich užitných parametrů s vlastním enzymaticky aktivním nanovlákněným systémem.

Na závěr bych ráda zdůraznila, že uvedené připomínky a náměty jsou pouze inspirativní a nikterak nesnižují vysokou odbornou úroveň předložené práce. Kvalitu práce dokládají opravdu hodnotné publikace, kde je dizertantka první autorkou nebo spoluautorkou. Dizertantka prokázala schopnost poutavě, ale přesto na vysoké odborné kvalitě popsat vymezenou problematiku, řešit složité vědecké problémy a pro jejich řešení využívat nejmodernější postupy. Autorka splnila vytčené cíle práce beze zbytku. Vzhledem k uvedenému doporučuji práci přijmout k obhajobě a Mgr. Maryškové po úspěšné obhajobě udělit titul Ph.D.

V Pardubicích 24. 4. 2020

prof. RNDr. ~~Zuzana~~ Zuzana Bílková, Ph.D.

Helmholtz Centre for Environmental Research – UFZ
Permoserstr. 15 • 04318 Leipzig • Germany

Prof. Ing. Zdeněk Plíva, Ph.D.
Dean of the Faculty of Mechatronics,
Informatics and Interdisciplinary Studies
Technical University Liberec
Studentská 2
461 17 Liberec I
Czech Republic

Leipzig, 14 May 2020

Dr. Dietmar Schlosser
Group Leader
Environmental Mycology
Department of
Environmental Microbiology
fon +49 341 235 1329
dietmar.schlosser@ufz.de

Dissertation thesis of Ing. Milena Maryšková “Enzymatically activated filters for water treatment”: Report of the opponent

The PhD thesis entitled “Enzymatically activated filters for water treatment”, which has been submitted to the Technical University Liberec by Ing. Milena Maryšková, addresses the problem of emerging (micro-)pollutants (e.g. endocrine disrupting chemicals = EDCs, pharmaceutically active compounds) in wastewaters and effluent-receiving waters, and the typically incomplete removal of such compounds during conventional wastewater treatment. The thesis aims to contribute to the development of biochemical (enzymatic) (waste)water treatment methods for the removal of such pollutants, as an alternative to physico-chemical methods (e.g. ozonation, treatment with powdered activated carbon) currently also widely considered for the aforementioned purpose. Without any doubt, the thesis is focusing on an important issue of global relevance. The need for the development of adequate wastewater treatment technologies (sometimes referred to as additional fourth treatment stage) has initiated a wide range of related research activities during the last decade. The application of versatile and robust enzymes in immobilized form, an approach also taken by the present thesis, can be considered as one of the most promising biochemical attempts to remove micro-pollutants from waters.

To overcome known draw-backs of physico-chemical treatment methods was a strong motivation for the focus on biochemical (enzymatic) treatment in the present thesis. As a starting point, nanofibers were identified as promising carriers for enzyme immobilization as these materials are easy to handle, safe, and provide a high specific surface area. The cost efficiency of enzyme-nanofiber materials was considered as another important factor for technical applicability. Laccases and peroxidases were employed as promising candidate enzymes. Among the multitude of different enzyme immobilization techniques found in the literature, enzyme immobilization onto nanofibers

Helmholtz Centre for
Environmental Research – UFZ

Company domicile: Leipzig

Permoserstr. 15, 04318 Leipzig,
Germany
or
PF 500136, 04301 Leipzig, Germany
phone +49 341 235-0

info@ufz.de
www.ufz.de

Registration court: Leipzig district court
Commercial register No. B 4703

Chairman of the Supervisory Board:
MinDir'g'in Oda Keppler

Scientific Director:
Prof. Dr. Georg Teutsch

Administrative Director:
Dr. Sabine König

Bank details:
HypoVereinsbank Leipzig
Sort code 860 200 86
Account No. 5080 186 136
Swift (BIC) code HYVEDEMM495
IBAN No. DE12860200865080186136
VAT No. DE 141 507 065
Tax No. 232/124/00416



based on three different types of synthetic polymers was investigated. In the present thesis, all of these taken approaches were well justified based and deduced from the recent state of knowledge, which was comprehensively (but nonetheless concisely) and critically reviewed in the theoretical background section. The employed multi-track research strategy enabled to identify the most suitable enzyme candidate, and the optimal immobilization method. In this context, the multitude of experiments performed, and the huge amount of valuable data generated deserves respect and recognition. Finally, laccase coupling onto poly(acrylic acid) via EDAC and S-NHS activation turned out to be the method of choice; providing high activity and stability of the immobilized enzyme.

Remarkably, the degradation efficiency of the most promising biocatalyst obtained was also tested in a real wastewater matrix with a mixture of four important micropollutant representatives (bispheol A, 17 α -ethinyloestradiol, triclosan, and diclofenac); thereby clearly going beyond the scope of many other studies with a similar focus. Indeed, to maintain the operational stability of enzyme-based biocatalysts under the often unfavorable conditions of real wastewaters is one of the major challenges related to this potential technology. In my opinion, taking this challenge convincingly underlines the originality of the research conducted by the author of this dissertation work. A considerable activity and robustness (in terms of storage stability and reusability) of the obtained biocatalyst under real wastewater conditions could be demonstrated. In my opinion, especially this particular result represents a significant contribution to the research field of concern also at international scale. As frequently observed also by others, particularly low concentrations of micropollutants were found to be unfavorable for their efficient enzymatic removal. Nevertheless, the results of the present dissertation clearly encourage future research into this field of application. One very interesting potential future line of research, which deserves to be addressed in more experimental detail, relates to the full technological exploitation of the structural variability of nanofiber materials as convincingly outlined by the author of the thesis in chapter 16.

From my point of view, the following questions remain and could be addressed in more detail:

- What was the reason for the higher activity of the crude laccase (compared to the commercial *Tametes versicolor* laccase) in repeated catalytic cycles (Fig. 48d; page 87), and the higher storage stability of the crude laccase (Fig. 51, page 91)? A possible explanation given in the thesis states "This can be explained by the presence of multiple isozymes and other biomolecules originating from the cultivation medium, which became attached or adsorbed into the nanofiber structure together with the targeted laccase. As a result, these biomolecules provided an environment enhancing both activity and stability of the immobilized enzyme molecules." (page 88). I agree that the presence of isoenzymes could be an explanation. But what exactly is meant with "other biomolecules" – could these be specified in more detail?

- A further question relates to the results of the chapters 15.3 (especially Fig. 52c) and 15.4 (Fig. 54). In the context of the lower pollutant degradation rates at 100 times lower initial pollutant concentrations and increased reaction volume (or in other words, decreased amount of immobilized laccase) as shown in Fig. 54, it is stated that "The higher volume negatively

influenced removal speed, and showed a more significant effect than EDC concentration." (page 95).". I assume that the higher influence of the reaction volume (compared to the EDC concentration) was deduced from the clearly different removal rates observed at 2 and 5 discs, respectively (Fig. 54) – is this correct? In this context, what is known with respect to K_m values of the applied laccase (or of laccases in general) for the applied EDCs – are there related literature data?

- It is very well known that micro-pollutants (EDCs and others) occur in wastewaters typically at very low concentrations. In the present work this problem was also adequately addressed (EDCs were also applied at 100 $\mu\text{g/L}$ in order to meet more environmentally relevant conditions, compared to a rather high concentration of 10 mg/L). On the other hand, enzymatic degradation rates would depend on the substrate (pollutant) concentration, and hence very low pollutant concentrations in wastewaters could not always be favorable for the application of enzyme-based technologies. In this context I have two questions: Are there types of wastewaters/effluents (containing EDCs/pharmaceuticals), which would be expected to be more favorable for enzymatic/biocatalytic treatment than others (e.g., typical domestic wastewaters), because of presumably higher micro-pollutant concentrations? Also in this context, are there ideas regarding technological solutions, which may lead to an improved availability of pollutants for degrading enzymes/biocatalysts?

Generally, I consider this thesis to be very well organized and structured, well written, and easy to follow. Both the introduction and the theoretical background section are very informative and clearly point to the problems and objectives intended to be addressed within the present work. The materials and methods section is sufficiently informative to enable a reproduction of the work. The experiments seem well performed. The results are well presented with the help of numerous meaningful figures, and seem sound and unambiguous. The respective discussions are relevant and reflect the current state-of-the-art. The conclusions drawn in the conclusion section are justified by the obtained results. The thesis ends with a comprehensive and up-to-date reference list.

I recommend this dissertation for defense.

With kind regards
Dr. Dietmar Schlosser

