Uniwersytet Gdański | Uczelnie Fahrenheita

Dr hab. Beata Liberek, prof. UG
Kierownik Pracowni Glikochemii
Katedra Chemii Organicznej

Gdańsk, 27.12.2023 r.

**RECENZJA jawna**

częściowo utajnionej pracy doktorskiej magister Reginy Michalik pt.: „Synteza, charakterystyka i wykorzystanie pochodnych chitozanu do otoczkowania nawozów na bazie azotanu(V) amonu"

Recenzowana praca doktorska została wykonana w ramach III Edycji programu „Doktorat wdrożeniowy" w laboratoriach Departamentu Rozwoju Grupy Azoty Zakłady Azotowe Kędzierzyn S.A. Promotorem pracy jest prof. Ilona Wandzik z Katedry Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii, Wydział Chemiczny Politechniki Śląskiej, a opiekunem przemysłowym inż. Krzysztof Kozioł z Grupy Azoty ZAK.

Pani mgr Regina Michalik uzyskała tytuł zawodowy magistra w 2014 roku na Wydziale Chemicznym Uniwersytetu Wrocławskiego. Od 2014 roku jest pracownikiem Grupy Azoty ZAK. W roku 2019 rozpoczęła studia doktoranckie na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej w Gliwicach, których efektem końcowym jest oceniana rozprawa doktorska.

Celem pracy było opracowanie biopolimeru, opartego na chitozanie, i zastosowanie go do otoczkowania nawozu na bazie azotanu(V) amonu. Otoczkowanie nawozów spowalnia ich uwalnianie i zapewnia lepszą kontrolę tego procesu. Poszukiwanie skutecznych, najlepiej biodegradowalnych, materiałów do otoczkowania nawozów wpisuje się w nowoczesne trendy światowego rolnictwa i ogrodnictwa.

Układ części jawnej pracy doktorskiej jest typowy i zawiera wszystkie niezbędne elementy tego rodzaju monografii. Doktorantka właściwie sformułowała cel i zakres pracy i dokonała ściśle związanego z tematem pracy przeglądu literatury, do którego wykorzystała 191 pozycji obejmujących ostatnie 10-15 lat.

Realizację pracy doktorskiej p. Michalik rozpoczęła od oceny właściwości fizykochemicznych trzech chitozanów (**1-3**), które różniły się deklarowaną masą i/lub miejscem wyprodukowania. Stosując niezależnie miareczkowanie potencjometryczne, spektroskopię UV-VIS i analizę elementarną, Doktorantka wyznaczyła stopień deacetylacji zakupionych chitozanów i uzyskane

Wydział Chemii UG
tel. +48 58 523 50 71
e-mail: beata.liberek@ug.edu.pl
ul. Wita Stwosza 63
80-308 Gdańsk
www.ug.edu.pl
CHEMIA UG

wyniki porównała z deklaracjami producentów. Dla chitozanu **3**, który był w kolejnym etapie modyfikowany, p. Michalik wyznaczyła dodatkowo stopień deacetylacji na podstawie widma $^1$H NMR, uzyskując w tym przypadku wynik 83,63%, pokrywający się z deklaracją producenta (83%). Z uwagi na to, że spektroskop NMR jest kosztowny, za najbardziej efektywną spośród łatwo dostępnych metod wyznaczania stopnia deacetylacji Doktorantka uznała miareczkowanie potencjometryczne, choć zgodność z deklaracją producenta była w tej metodzie nieco gorsza.

Do wyliczenia stopnia deacetylacji na podstawie miareczkowania potencjometrycznego p. Michalik zastosowała trzy wzory zapożyczone z literatury i uzyskane wyniki porównała ze sobą. W tym miejscu chciałabym zwrócić uwagę, że w matematyce wzór funkcji, opartej o te same zmienne może być tylko jeden. I dlatego, z trzech wzorów 1-3 użytych do wyliczenia stopnia deacetylacji tylko wzór 1 jest zgodny z jego definicją, przedstawioną na str. 26. Wzory 2 i 3, po pierwsze, wyrażają co innego (proszę żeby Doktorantka dopowiedziała co), a po drugie, wzór 2 jest tożsamy z wzorem 3 pomnożonym razy 100. Te fakty nie mają swojego odzwierciedlenia w wartościach podanych w Tabeli 9. Proszę Doktorantkę o komentarz.

Podobną uwagę mam do wzorów 6 i 7 użytych do wyliczenia stopnia deacetylacji z danych analizy elementarnej. Wzory te uzależnione są od tej samej zmiennej (C%/N%) i są tożsame. Nie ma sensu stosować ich obu. Tego nie widać na pierwszy rzut oka, bo są one zapisane w skomplikowany sposób, tak jak i inne wzory prezentowane w pracy. Gdy stosunki C/N podane we wzorze 7 policzy się z mas wyrażonych w liczbach całkowitych to będą one wynosiły odpowiednio 5,143 i 6,857 i wtedy wzór 7 wyraża dokładnie to samo co wzór 6.

Zastosowania chitozanu zależą nie tylko od stopnia deacetylacji, ale też od jego masy molowej. Dlatego też, p. Michalik wyznaczyła średnie masy molowe zakupionych chitozanów, stosując do tego celu chromatografię żelową. Co istotne, Jej badania wykazały, że dwa spośród trzech chitozanów (**1** i **2**) nie spełniają zadeklarowanych przez producenta parametrów. Oznaczone średnie masy molowe w ich przypadku były znacznie niższe niż gwarantował producent. Wynik ten został potwierdzony na etapie badania rozpuszczalności chitozanów **1-3** oraz pomiarów lepkości dynamicznej przygotowanych roztworów. W tym miejscu chciałabym zwrócić uwagę, że masa cząsteczki wyrażona w g/mol jest jej masą molową, a nie cząsteczkową jak podaje Doktorantka pod wzorem 10.

W celu poprawienia rozpuszczalności zakupionego chitozanu **3** w wodzie, p. Michalik zsyntezowała jego dwie pochodne: 2-hydroksypropylo-3-trimetyloamoniowy chlorek chitozanu (HACC) oraz karboksymetylochitozan (CMC). Przeprowadzone modyfikacje chitozanu są znane w literaturze, niemniej, praca na substracie o charakterze polimeru jest wymagająca, szczególnie w odniesieniu do analizy produktu. W opisach syntez zastanawia mnie wskazany stosunek molowy chitozanu do użytych reagentów. Na przykład, „stosunek molowy GTMAC do chitozanu wynosił 5:1". Jak Doktorantka rozumie taki stosunek molowy?

Widmo $^1$H NMR posłużyło Doktorantce do wyznaczenia stopnia czwartorzędowania w pochodnej HACC, które, stosownie do wzoru 9, wynosiło 98,29%. I tu chciałabym się zapytać czy

intensywności protonu H-2(GlcN) we wzorze 8 i 9 znaczą to samo? Dlaczego ta intensywność we wzorze 9 jest odjęta od intensywności metyli grupy amoniowej ($I_{N+(CH3)3}$) i podzielona przez 9?

Miareczkowanie potencjometryczne wykonane dla pochodnej HACC charakteryzuje się tylko jednym punktem przegięcia, co p. Michalik uznała za dowód całkowitego czwartorzędowania chitozanu. Pewna kwestia wymaga tu wyjaśnienia. Ponieważ reakcja zwana tu czwartorzędowaniem, jest *de facto* alkilowaniem grupy aminowej, prowadzącym do drugorzędowej aminy to czy Doktorantka zakłada, że taka grupa aminowa nie ma właściwości zasadowych?

Stopień czwartorzędowania został też wyznaczony za pomocą miareczkowania konduktometrycznego. Posiłkując się wzorem 10 Autorka uzyskała wartości DQ 100% i 105%, w zależności od próbki. W tym miejscu nasuwa mi się pytanie do Doktorantki. Jak, bazując na wzorze 10, należy interpretować 100% czwartorzędowania? Nie jest też dla mnie jasne jakie dane pozwoliły 83% czwartorzędowania przydzielić azotowi, a 17% tlenowi. Wydaje mi się, że sygnalizowane rozszczepienie odpowiednich sygnałów w widmie $^1$H NMR nie wskazuje na takie wartości.

Otrzymanie pochodnej karboksymetylowej chitozanu (CMC) potwierdziła Doktorantka analizując jej widma FTIR i NMR. Stopień podstawienia karboksymetylem obliczyła stosując wzory literaturowe i zmierzone w widmie $^1$H NMR intensywności odpowiednich protonów. W tym przypadku sygnał o intensywności $I_3$ w zakresie 3,0-3,3 ppm został potraktowany jako złożenie sygnału protonów przy węglu C-2 w pierścieniu GlcN i GlcNAc. Tymczasem, przy wyznaczaniu stopnia deacetylacji chitozanu sygnał przy 3,18 ppm został przypisany wyłącznie protonowi przy węglu C-2 w pierścieniu GlcN. Proszę o wyjaśnienie. Wyznaczony ze wzoru 11 stopień podstawienia karboksymetylem wynosił 108%, z czego 76% stanowi podstawienie grupy aminowej. Tymczasem, widmo $^1$H NMR pochodnej CMC wyraźnie wskazuje, że $I_3$ jest znacznie większe niż $I_2$. W takim razie stopień podstawienia grupy $NH_2$ uzyskany ze wzoru 12 ($I_2/ I_2 + I_3$) powinien być zdecydowanie mniejszy niż 50%. Gdzie tkwi błąd?

Zsyntezowane pochodne chitozanu posłużyły p. Michalik do otrzymania nieznanych dotąd w literaturze koacerwatów, będących mieszaninami o różnym stosunku objętościowym roztworów HACC i CMC. Doktorantka przeprowadziła dla nich badania chłonności wody i wykazała, że mają one cechy hydrożelu fizycznego. Badania te stały się podstawą wynalazku zgłoszonego do Urzędu Patentowego RP.

Zarówno pochodne chitozanu (HACC i CMC) jak i ich koacerwaty Doktorantka zbadała pod kątem tworzenia filmów. Niektóre z koacerwatów takie filmy tworzyły. Pani Michalik udowodniła też, że możliwa jest wieloetapowa koacerwacja, która daje możliwości tworzenia wielowarstwowych otoczek.

W ostatnim etapie realizacji części jawnej doktoratu p. Michalik opracowała metody tworzenia folii chitozanowych z dodatkiem rozpuszczalników głęboko eutektycznych (DES). Przygotowała trzy mieszaniny DES o różnym składzie chemicznym i zmierzyła ich lepkość oraz gęstość. Badaniom poddała dwa chitozany różniące się średnią masą molową. Zrobiła z nich folie bez dodatku DES, a następnie szereg folii z dodatkiem trzech różnych mieszanin DES, użytych w

różnych proporcjach. W swoich badaniach udowodniła, że dodatek DES spowodował, iż folie stały się bardziej elastyczne. Najlepsze folie powstały na bazie chitozanu firmy Sigma z dodatkiem 5% roztworu $ZnCl_2$:glikol etylenowy w stosunku molowym 1:4. Dla nich wykonano badania właściwości mechanicznych, przeprowadzone w Laboratorium Aplikacyjnym Plastyfikatorów w Departamencie Rozwoju Grupy Azoty ZAK.

W części tajnej doktoratu p. Michalik opisała wykonane otoczkowania nawozu na bazie azotanu(V) amonu. Prowadziła je z użyciem kilkunastu roztworów chitozanowych, których skład i właściwości przebadała na wcześniejszych etapach pracy. Wykorzystała do tego nawóz produkowany przez Grupę Azoty ZAK i dostępny w zakładzie specjalistyczny sprzęt. Efekty tej części pracy stały się podstawą dwóch zgłoszeń do Urzędu Patentowego RP. Ponadto, Doktorantka przeprowadziła dokładną charakterystykę otrzymanych, otoczkowanych nawozów oraz zbadała szybkość wymywania z nich składników odżywczych niezależnie do wody i gleby. Część tajna zawiera też analizę rynkową nawozów o spowolnionym i kontrolowanym uwalnianiu, przeprowadzoną przez firmę zewnętrzną. Raport dotyczył rynku europejskiego i krajowego.

Oprócz wspomnianych trzech zgłoszeń patentowych, efektem realizacji projektu doktorskiego p. Michalik są też trzy publikacje, dwie opublikowane w *Przemyśle Chemicznym* i praca przeglądowa opublikowana w *Polymers*. Pani Michalik jest też współautorką wystąpień konferencyjnych. Ponadto, brała udział w licznych projektach realizowanych przez Grupę Azoty ZAK.

Podsumowując, p. Michalik w swojej pracy doktorskiej opracowała nowe technologie, wykorzystujące biopolimer jakim jest chitozan, do otoczkowania nawozu na bazie azotanu(V) amonu i udowodniła, że rozwiązania przez Nią zaproponowane przyczyniają się do spowolnienia uwalniania składników odżywczych z otoczkowanych nawozów. W pełni zrealizowała zaplanowane cele badawcze. Wykazała się przy tym dużą samodzielnością i kreatywnością. Pracując poza Uczelnią potrafiła skutecznie przeprowadzić badania i sensownie wykorzystać możliwości aparaturowe laboratoriów Grupy Azoty ZAK do realizacji postawionych sobie celów. Moje zapytania i prośby o komentarz dotyczą głównie obliczeń wykorzystywanych przez doktorantkę i nie umniejszają pozytywnej oceny całego przedsięwzięcia.

Nie mam wątpliwości, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, tekst jednolity: Dz.U. z 2021 r. poz. 478. W związku z tym składam wniosek do Rady Dyscypliny nauki chemiczne Politechniki Śląskiej o dopuszczenie Pani mgr Reginy Michalik do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora.

Podpisano odręcznie przez autora