Prof. dr hab. inż. Anna Witek-Krowiak
Katedra Zaawansowanych Technologii Materiałowych
Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska
ul. Smoluchowskiego 25, 50-372 Wrocław
tel. +4871-3203469; e-mail: *anna.witek@pwr.edu.pl*

Wrocław, 05-12-2023

Recenzja dotycząca utajnionej rozprawy doktorskiej
Pani mgr Reginy Michalik
pt. *„Synteza, charakterystyka i wykorzystanie pochodnych chitozanu do otoczkowania nawozów na bazie azotanu(V) amonu"*

Strona formalna

Podstawą wykonania oceny rozprawy doktorskiej Pani mgr Reginy Michalik było pismo prof. dr hab. inż. Doroty Neugebauer – przewodniczącej Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Śląskiej z dn. 11.10.2023, w sprawie wykonania oceny rozprawy doktorskiej. Opinię wykonałam zgodnie z obowiązującymi aktami prawnymi na podstawie dostarczonej dysertacji w wersji papierowej.

Praca doktorska Pani mgr Reginy Michalik zatytułowana *„Synteza, charakterystyka i wykorzystanie pochodnych chitozanu do otoczkowania nawozów na bazie azotanu(V) amonu"* została wykonana w Katedrze Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii, na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Ilony Wandzik oraz pod opieką opiekuna przemysłowego, inż. Krzysztofa Kozioła (Grupa Azoty Zakłady Azotowe Kędzierzyn S.A.). Praca była realizowana w ramach III edycji programu Doktorat Wdrożeniowy MEiN.

Tematyka przedstawionej rozprawy jest zgodna z moimi zainteresowaniami naukowymi (wytwarzanie i badanie folii biopolimerowych, otoczkowanie nawozów, kontrolowane uwalnianie składników). Jednocześnie oświadczam, że nie współpracowałam z Doktorantką, nie jesteśmy też współautorkami żadnej pracy naukowej.

Sylwetka Kandydatki

Pani mgr Regina Michalik jest współautorką 3 publikacji związanych z tematyką pracy doktorskiej o łącznym IF 5,32. Dwie prace przeglądowe dotyczą możliwości zastosowania chitozanu w rolnictwie, trzecia praca omawia charakterystykę hydrożeli uzyskanych z dwóch pochodnych chitozanu w procesie koacerwacji. Doktorantka jest również współautorką 3 zgłoszeń patentowych z tematyki realizowanej w ramach pracy doktorskiej. W ramach rozpowszechniania wyników swoich badań, zaprezentowała 2 postery na konferencjach krajowych oraz była współautorką wystąpienia ustnego. Pani Regina aktywnie uczestniczyła w 4 projektach realizowanych przez Grupę Azoty Zakłady Azotowe Kędzierzyn S.A.

Recenzowana rozprawa została formalnie podzielona na dwie części, jawną i tajną, co wiąże się ze specyfiką doktoratu wdrożeniowego, w czasie którego część badań i ich rezultaty są tajemnicą przedsiębiorstwa.

Rozprawa skupia się na opracowaniu biodegradowalnej otoczki nawozu na bazie azotanu(V) amonu z użyciem materiałów przyjaznych dla środowiska, celem zapewnienia kontrolowanego uwalniania składników do środowiska glebowego. Część jawna obejmuje charakterystykę fizykochemiczną dostępnych komercyjnie chitozanów, syntezę pochodnych chitozanu oraz wytworzenie i wstępną charakterystykę folii z (1) pochodnych chitozanu oraz (2) z chitozanu z dodatkiem rozpuszczalników głęboko eutektycznych. Część tajna skupia się na metodzie powlekania nawozów i ocenia skuteczność wytworzonych otoczek.

Ocena poprawności struktury

Część jawna składa się z 96 stron. Pracę rozpoczyna zestawienie stosowanych skrótów i symboli, kolejno przedstawiony jest *Cel i zakres pracy* (2 strony) oraz *Przegląd literatury* (21 stron), wprowadzająca czytelnika w tematykę badawczą. W następnym rozdziale, *Omówienie wyników* (34 strony), Doktorantka zamieściła wyniki części nieutajnionej badań oraz ich dyskusję. W kolejnym rozdziale zebrano *Podsumowanie i wnioski* (3 strony). *Część eksperymentalna* (12 stron), obejmująca opis sposobu prowadzenia doświadczeń znajduje się na samym końcu pracy. Można było umieścić ten rozdział przed omówieniem wyników, ułatwiłoby to czytelnikowi śledzenie koncepcji badań. Do rozprawy dołączono *Spis rysunków* (28 rysunków) i *Spis tabel* (24 tabel). Rysunki i tabele są czytelne i starannie wykonane. Cytowana *Literatura*, liczy 191 pozycji, jest właściwie dobrana. Dysertacja kończy się streszczeniami w języku polskim i angielskim (każda zajmuje stronę) oraz zestawieniem dorobku Doktorantki.

Wybór tematu

Dysertację rozpoczyna dwustronicowy rozdział *Cel i zakres pracy*, w którym Autorka uzasadnienia wybór problematyki badawczej oraz zarys najważniejszych prac wykonanych w ramach rozprawy. Podkreśliła, że realizowane badania wpisują się w Plan Prac Badawczych i Rozwojowych Grupy Azoty ZAK S.A., która zatrudnia Doktorantkę. Firma jest producentem granulowanych nawozów saletrzanych, popularnych na rynku krajowym i rynkach zagranicznych. Prace realizowane w ramach doktoratu wdrożeniowego koncentrowały się na możliwościach zastosowania biopolimeru – chitozanu jako surowca do wytwarzania otoczek na nawozie azotowym, spowalniających uwalnianie makroelementu. Działania te mają na celu poprawę jakości nawozu produkowanego przez Grupę Azoty ZAK. S.A i wpisują się w obecne trendy rolnictwa precyzyjnego.

Motywację do podjęcia tematyki Doktorantka uzasadniła również w kolejnej części pracy *Przegląd literatury*. Przegląd piśmiennictwa wprowadza czytelnika w aktualny stan wiedzy dotyczący nawozów o kontrolowanym i spowolnionym uwalnianiu, w szczególności w tematykę otoczek biodegradowalnych na bazie polimerów. Omówiono techniki powlekania nawozów, metody oceny szybkości uwalniania nawozów ze struktur otoczkowanych, dane

literaturowe zebrano w wygodnych dla czytelnika tabelach. W kolejnych rozdziałach Doktorantka opisała właściwości i zastosowanie chitozanu i możliwości aplikacji tego biopolimeru w rolnictwie. Kolejno scharakteryzowała mieszaniny głęboko eutektyczne (ang. *deep eutectic solvents*, DES) i wskazała możliwość ich zastosowania jako plastyfikatorów folii chitozanowych. Czytelnikowi brakuje łącznika części teoretycznej z następującym zaraz po niej omówieniem wyników. Rozdział *Omówienie wyników* obejmuje 5 głównych etapów (ocenę właściwości fizykochemicznych chitozanów komercyjnych, dwie metody modyfikacji chitozanu, otrzymywanie koacerwatów i wytwarzanie folii chitozanowych z użyciem DES), które w sposób czytelny i komplementarny realizują podjęte w pracy cele badawcze.

Nowatorski charakter rozprawy

Tematyka realizowana w ramach rozprawy doktorskiej jest aktualnym zagadnieniem, wpisującym się w światowe trendy współczesnego rolnictwa. Rosnąca populacja wymusza poszukiwania efektywnych metod zwiększania plonów, w czym z pewnością pomaga stosowanie nawozów. Jednak ich nadmierne użycie i straty głównych składników, spowodowane wymywaniem i innymi procesami zachodzącymi w glebie, zmuszają do poszukiwania rozwiązań spowalniających ich uwalnianie do środowiska i dostosowanie tempa uwalniania do potrzeb roślin uprawnych. Takie kryteria mogą spełnić nawozy nowej generacji, takie jak nawozy o kontrolowanym i spowolnionym uwalnianiu, w tym nawozy otoczkowane. Najnowsze rozporządzenia UE, związane z rynkiem nawozów otoczkowanych, wymuszają na producentach konieczność dostosowania się do wysokich wymagań jakimi są kryteria biodegradowalności otoczek. Podjęta tematyka badawcza jest zatem bardzo ważna, zważywszy na współczesne problemy rolnictwa i konieczność ich natychmiastowych rozwiązań.

Chitozan jest biopolimerem wytwarzanym z powszechnie dostępnych surowców poprzez deacetylację chityny. Pani Regina postanowiła wykorzystać ten związek do tworzenia pochodnych, które po zmieszaniu tworzą koacerwaty, które można z powodzeniem stosować do wytwarzania folii. W pracy szczegółowo opracowano koncepcję tej technologii. Jest to bez wątpienia nowość naukowa, wynalazek został zgłoszony do urzędu patentowego. Kolejnym aspektem innowacyjności przestawionej koncepcji jest możliwość zastosowania biodegradowalnych otoczek na bazie chitozanu jako powłok zabezpieczających nawozy azotowe. Część badawcza związana z tą tematyką jest jednak objęta tajemnicą przedsiębiorstwa, w części jawnej wspomniano o dwóch zgłoszeniach patentowych z tej tematyki.

Zakres i cel pracy

Celem rozprawy była ocena możliwości zastosowania pochodnych chitozanu jako otoczek nawozów azotowych. W części jawnej rozprawy Doktorantka zajęła się (1) oceną właściwości fizykochemicznych chitozanu, (2) syntezą pochodnych chitozanu i przygotowaniem koacerwatów, (3) opracowaniem i określeniem właściwości folii z koacerwatów oraz na bazie chitozanu z dodatkiem mieszanin głęboko eutektycznych.

W pierwszej części badań pani mgr Regina Michalik wytypowała metody oceny podstawowych właściwości fizykochemicznych chitozanu (oznaczenie stopnia deacetylacji,

masy molowej, rozpuszczalności chitozanu i lepkości roztworów). Do analiz wykorzystano dostępne w firmie sprzęty i dostosowano istniejące techniki analityczne.

Zakupiono 3 chitozany, od różnych producentów, różniące się znacząco masą molową i stopniem deacetylacji. Do odznaczenia stopnia deacetylacji Doktorantka wybrała miareczkowanie potencjometryczne, spektroskopię UV-Vis i analizę elementarną oraz różne wzory, pozyskane z literatury, umożliwiające przeliczenie wyników. Doktorantka wytypowała metodę miareczkowania potencjometrycznego jako najlepszą spośród trzech zaproponowanych. Nie wskazała jednak, który wzór (1-3) powinien służyć do przeliczania wartości końcowej. Wszystkie trzy dają różne wyniki. Oznaczenia masy molowej chitozanu wykonano stosując chromatografię żelową. Dla dwóch chitozanów uzyskano wyniki dalece odbiegające od deklaracji producenta. W kolejnym kroku pani Regina zbadała rozpuszczalność chitozanu w trzech rozpuszczalnikach o stężeniu 1% (kwasy: octowy, mrówkowy i mlekowy). Stężenie chitozanu w próbkach wynosiło 0,01-0,04 g/ml. Dla próbek, w których zyskano całkowite rozpuszczenie chitozanu, dokonano pomiaru lepkości roztworów. W tej sekcji zabrakło szerszej dyskusji wyników, porównania z wynikami podobnych badań dostępnych w literaturze.

Następny etap badań obejmował przygotowanie pochodnych chitozanu. Autorska zdecydowała się na syntezę czwartorzędowej soli amoniowej chitozanu, bazując na dostępnej w literaturze metodyce. Reakcji poddano chitozan o największej wyznaczonej masie molowej, uzyskując 2-hydroksypropylo-3-trimetyloamoniowy chlorek chitozanu (HACC) z wydajnością powyżej 73% i 78%, w zależności od metody oczyszczania produktu. Strukturę zawierającą czwartorzędowe grupy amoniowe potwierdzono za mocą widm FTIR i ^{1}H NMR. W kolejnym etapie zaproponowano wytwarzanie karboksymetylochitozanu, CMC, (także z chitozanu o największej wyznaczonej masie molowej), zgodnie z metodyką opisaną w literaturze. Uzyskano oczekiwany związek z wydajnością ponad 73%, jego strukturę potwierdzono widmami FTIR, 1H NMR i ^{13}C NMR.

Dalsze prace obejmowały wytwarzanie koacerwatów na bazie przygotowanych wcześniej pochodnych. Takie podejście jest istotnym elementem nowości, brak jest doniesień literaturowych o tego rodzaju koacerwatach. W wyniku połączenia kationowej czwartorzędowej soli amoniowej chitozanu oraz anionowego karobksymetylochitozanu w różnych proporcjach objętościowych, Doktorantka uzyskała nierozpuszczalne kompleksy, które oddzieliła od roztworu. Wybrane koacerwaty zostały poddane próbie pęcznienia w wodzie. Ciekawym uzupełnieniem mogłoby być określenie kinetyki pęcznienia. Na bazie koacerwatów przygotowano również cienkie filmy, część z nich (K4-K6) nie rozpuściła się w wodzie nawet po 7 dniach, co świadczy o wytworzeniu trwałych kompleksów. Wykonano także badanie potwierdzające możliwość tworzenia koacerwatów z nanoszonych na siebie warstw obu pochodnych chitozanu, co może być wykorzystane do tworzenia wielowarstwowych powłok na nawozach. Czytelnik może czuć niedosyt w związku z oceną fizykochemiczną wytworzonych folii, nasuwają się dodatkowe pytania, np. czy są one stabilne, czy mają odpowiednią wytrzymałość, czy są elastyczne, po jakim czasie i w jakich warunkach ulegają degradacji?

Ostatnim etapem jawnej części pracy jest analiza dodatku mieszanin głęboko eutektycznych jako plastyfikatorów do folii chitozanowych. Doktorantka przygotowała receptury dla uzyskania elastycznych folii i potwierdziła korzystny wpływ DES. W moim odczuciu w tym rozdziale również brakuje porównania uzyskanych wyników z doniesieniami

literaturowymi w tym temacie. W tym miejscu pojawia się także pytanie dlaczego Doktorantka testowała tylko układ z chitozanem a nie koacerwatami, z których przygotowała folie w poprzednim rozdziale?

Ocena poziomu edytorskiego rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska (jej część jawna) jest bardzo obszerna, zajmuje 96 stron. Zredagowana jest w sposób przejrzysty i elegancki. Niektóre wykresy są jednak nieczytelne – np. Rys. 22, warto zwiększyć czcionkę. Autorka nie ustrzegła się drobnych błędów edycyjnych, np. str. 35, $V_R = f(lgM)$, zapewne log a nie lg. Te nieliczne mankamenty nie mają istotnego wpływu na moją wysoką ocenę merytoryczną rozprawy.

Uwagi szczegółowe i kwestie wymagające wyjaśnień

Podjęte przez Doktorantkę badania mają potencjał aplikacyjny. Autorka uzyskała szereg wartościowych wyników, które mogą mieć istotne znaczenie dla opracowania nowych typów otoczek nawozowych. Zasadnicze uwagi i komentarze dotyczące rozprawy doktorskiej zebrałam w poniższych punktach:

1. *Tabela 12, str 32.* Zawartość C i N w próbkach powinna być podana wraz z odchyleniem standardowym.
2. *Str 33.* Doktorantka uznała metodę miareczkowania na najlepszą do wyznaczenia stopnia deacetylacji chitozanu, nie podała jednak który z wzorów pozwoli na uzyskanie najbardziej miarodajnych wyników. Między wynikami są spore rozbieżności.
3. *Str. 35.* Wyniki mas molowych uzyskanych przez Doktorantkę są dalekie od wartości deklarowanych przez producenta chitozanów. Czy jakiekolwiek doniesienia literaturowe lub inna metoda pomiarowa mogą potwierdzić nieprawdziwość pomiarów producenta (Acros Organics)?
4. *Str. 39.* Czy Doktorantka podjęła próbę syntezy czwartorzędowej soli amoniowej chitozanu w innych warunkach? Jakie było uzasadnienie wyboru stosunku molowego GTMAC do chitozanu, typu chitozanu i środowiska reakcji? Podobnie na str. 46 – dla reakcji karboksymetylowania chitozanu.
5. Proszę uzasadnić wybór mieszanin głęboko eutektycznych do badań (także uzasadnienie wybranych stosunków HBA:HBD).
6. Proszę uzasadnić wybór stężeń chitozanu do przygotowania folii. Dlaczego do wytworzenia folii z dodatkiem mieszaniny chlorku choliny i mocznika zastosowano stężenie 2 i 4%, gdy w przypadku pozostałych DES dodawano stężenia w zakresie 1- 10%?

Podsumowanie

Recenzowana rozprawa stanowi przykład szeroko zaplanowanych badań, obejmujących poprawne przygotowanie eksperymentów, ich przeprowadzenie, i interpretację wyników. Przedstawione w pracy wyniki doświadczalne stanowią wartościowy materiał. Doktorantka dowiodła, że jest dobrze przygotowana do realizacji prac badawczych. Praca zawiera istotne

elementy nowości, w tym wytwarzanie koacerwatów z pochodnych chitozanu, otoczkowanie nawozów polimerami na bazie chitozanu. Przedstawione powyżej uwagi i zapytania mają charakter dyskusyjny i nie podważają ogólnej bardzo pozytywnej oceny pracy. Doktorantka podjęła w swej rozprawie ważne i złożone zagadnienia w zakresie oceny możliwości wykorzystania chitozanu i jego pochodnych do przygotowania otoczek nawozowych.

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca doktorska pani mgr Reginy Michalik, pt. „Synteza, charakterystyka i wykorzystanie pochodnych chitozanu do otoczkowania nawozów na bazie azotanu(V) amonu" **spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późniejszymi zmianami)**, wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Śląskiej o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Podpisano odręcznie przez autora