

Warszawa, 10.12.2025

dr hab. inż. Małgorzata M. Jaworska, profesor uczelni

Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej

Politechnika Warszawska

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Zofii Nuc

pt. „Wybrane skorupiaki z wód polskich jako alternatywne źródło chityny i chitozanu”

Promotor: dr hab. Aldona Dobrzycka-Kraheil, prof. UWSB Merito

Podstawą do przygotowania recenzji jest pismo prof. dr hab. Magdaleny Bełdowskiej, Przewodniczącej Rady Dyscypliny Nauki o Ziemi i Środowisku, Uniwersytetu Gdańskiego z 17. 10 2025 z prośbą o przygotowanie recenzji doktoratu mgr Zofii Nuc zatytułowanego „Wybrane skorupiaki z wód polskich jako alternatywne źródło chityny i chitozanu”.

1. Treść i zakres rozprawy doktorskiej

Praca przedstawiona do oceny poświęcona jest otrzymywaniu oraz analizie własności chityny oraz chitozanu otrzymanego z czterech gatunków skorupiaków występujących w wodach polskich: raka błotnego (*Astacus leptodactylus*), raka pręgowanego (*Faxonius limosus*), kielża (*Dikerogammarus villosus*) oraz lasonoga (*Neomysis integer*). Podstawą oceny jest cykl 3 publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe mgr Zofii Nuc.

Chityna oraz chitozan to polimery o dobrze udokumentowanej bioaktywności i dużym potencjale aplikacyjnym. W chwili obecnej głównym źródłem tych polimerów są pancerzyki krewetek i krabów, skorupiaków wykorzystywanych w przemyśle spożywczym. Ze względu na duże zapotrzebowanie na oba polimery (głównie dla zastosowań w ochronie środowiska, rolnictwie, czy w przemyśle farmaceutycznym jako źródło glukozyminy) badane są możliwości izolacji chityny z alternatywnych źródeł takich jak owady, grzyby, grzyby strzępkowe czy skorupiaki słodkowodne oraz zooplankton. Jednocześnie poszukuje się nowych metod izolacji chityny, gdyż proces chemiczny jest szkodliwy dla środowiska ze względu na duże zużycie żrących chemikaliów (stężone NaOH, stężone kwasy), znaczne zużycie wody, duże zużycie energii i produkcję znacznej ilości ścieków trudnych do utylizacji. Z tych to względów tematyka podjęta przez Doktorantkę dobrze wpisuje się w nowe tędy badawcze.

Mgr Zofia Nuc jako podstawę oceny przedstawiła 3 publikacje z czego tylko 2 zostały opublikowane, natomiast trzecia publikacja została zamieszczona w postaci manuskryptu wysłanego do recenzji („For peer review”). Pierwsza z prac to praca przeglądowa poświęcona omówieniu źródeł chityny, chemicznych metod jej izolacji, metod deacetylacji chityny do chitozanu, omówieniu własności antybakteryjnych, przeciw grzybiczych i przeciw wirusowych. W pracy Doktorantka krótko wspomina o możliwości wykorzystania naturalnych roztworów głęboko eutektycznych (NADES) do ekstrakcji chityny z pancerzy skorupiaków.

Kolejna praca to badania poświęcone wykorzystaniu pancerzy raka błotnego oraz raka pręgowanego jako nowego źródła chityny. Chityna izolowana była klasyczną metodą chemiczną: w pierwszej kolejności pancerze skorupiaków demineralizowano z wykorzystaniem 3,6% HCl, a następnie odbiałczano z wykorzystaniem 8% NaOH. Równolegle pancerze traktowano mieszaniną chlorku choliny i kwasu malonowego (NADES) w celu ekstrakcji chityny. Polimer uzyskany metodą chemiczną poddano dodatkowo deacetylacji 60% NaOH w celu przekształcenia go w chitozan.

Wszystkie polimery otrzymane z pancerzy raka błotnego oraz raka pręgowanego analizowano pod kątem czystości z wykorzystaniem widma podczerwieni (FTIR), przeprowadzono także ich badania termogravimetryczne (TG) oraz przeprowadzono obserwacje powierzchni cząstek polimerów z wykorzystaniem elektronowej mikroskopii skaningowej (SEM). Chitozan dodatkowo analizowano pod kątem rozkładu mas cząsteczkowych (chromatografia żelowa), oraz określono jego aktywność przeciwbakteryjną i cytotoksyczność.

W trzeciej publikacji przedstawionego cyklu, chitynę ekstrahowano z kełży oraz lasonogów, przeprowadzając badania i charakteryzując otrzymane polimery w analogiczny sposób jak w publikacji drugiej.

Reasumując, chitynę wyizolowano z 4 gatunków skorupiaków, porównując polimery izolowane klasyczną metodą chemiczną oraz metodą wykorzystującą naturalną mieszaninę głęboko eutektyczną, a także deacetylowano chitynę do chitozanu i badano go pod kątem możliwości wykorzystania chitozanu w zastosowaniach medycznych.

Przewodnik po publikacjach (tekst w j. polskim) w pierwszej kolejności wprowadza czytelnika w zagadnienia omawiane i badane w pracy skupiając się na przedstawieniu chityny, źródeł jak pozyskiwania, metod ekstrakcyjnych, przedstawiono własności chitozanu uwypuklając jego potencjalne zastosowania medyczne. Następnie przedstawiono hipotezę badawczą i cele badawcze przyświecające Doktorantce. W kolejnej części autoreferatu zaprezentowano metodykę badań oraz omówiono uzyskane wyniki łącząc dane uzyskane dla wszystkich 4 źródeł chityny.

W pracy zamieszczono wszystkie publikacje stanowiące podstawę rozprawy. Wszystkie publikacje napisane są w j. angielskim i 2 z nich zostały już opublikowane, natomiast trzecia publikacja załączona jest w postaci manuskryptu wysłanego do wstępnej recenzji (czasopismo Marine Drugs).

2. Ocena merytoryczna rozprawy

Recenzowana rozprawa doktorska miała na celu sprawdzenie możliwości wykorzystania wybranych skorupiaków wód polskich jako alternatywnego źródła chityny i chitozanu w celu pozyskiwania polimerów do zastosowań medycznych (hipoteza badawcza nr 1). Sprawdzone także możliwość ekstrakcji chityny z wykorzystaniem naturalnych roztworów głęboko eutektycznych, co pozwoliłoby na stosowanie metody przyjaznej środowisku (hipoteza badawcza nr 2).

Przed rozpoczęciem badań Doktorantka przygotowała przegląd literatury (publikacja 1), w której skupiła się na przedstawieniu budowy oraz własności chityny, źródeł i metod jej izolacji (metoda chemiczna, elektrochemiczna, metoda biologiczna). W publikacji przedstawiono także budowę i metody deacetylacji chityny w celu przekształcenia jej

do chitozanu, oraz własności chitozanu ze szczególnym ukierunkowaniem na własności antybakteryjne, przeciwwgrzybiczne i przeciwwirusowe. W pracy bardzo skrótowo i szcątkowo przedstawiono stan wiedzy dotyczący wykorzystania NADES do ekstrakcji chityny z pancerzy skorupiaków wspominając jedynie, że istnieje taka możliwość i przywołując jedynie 4 publikacje związane z tą tematyką. W autoreferacie nie uzupełniono tej luki, nie przedstawiono aktualnego stanu wiedzy na temat wykorzystania NADES do ekstrakcji chityny z pancerzy skorupiaków. W pozostałych publikacjach Doktorantki również nie odniesiono się do aktualnego stanu wiedzy, choć izolacja chityny z pancerzy różnych skorupiaków z wykorzystaniem NADES prowadzona jest już od 15 lat. Uważam, że praca znacznie zyskałaby, gdyby w Doktorantka zaprezentowała dane literaturowe dotyczące wykorzystania NADES do ekstrakcji chityny z pancerzy skorupiaków. Pozwoliłoby to także na porównanie wyników uzyskanych przez Doktorantkę z danymi literaturowymi.

Pozostałe dwie publikacje to prace wieloautorskie (po 14 autorów), gdzie Doktorantka jest autorem korespondencyjnym. Analizując jednak informacje zamieszczone w tych publikacjach Doktorantka była odpowiedzialna za „software”, „formal analysis”, „investigation”, „data curation”, „writing”, „editing”, „visualization”. Zwraca uwagę fakt, że Doktorantka nie jest wymieniana pośród osób odpowiedzialnych za koncepcję badań („conceptualization”) oraz, że badania były wykonywane („investigation”) przez 10 osób. Które badania spośród zamieszczonych w publikacjach były wykonywane samodzielnie przez Doktorantkę, a które we współpracy z innymi wykonawcami? Jaki jest procentowy udział Doktorantki w prezentowanych badaniach?

Druga publikacja prezentowanego cyklu poświęcona jest wykorzystaniu pancerzy raka błotnego i raka pręgowanego jako alternatywnego źródła chityny. Chitynę izolowano klasyczną metodą chemiczną oraz metodą z wykorzystaniem NADES (bezpośrednio i po wcześniejszym potraktowaniu pancerzy kwasem cytrynowym). W badaniach Doktorantki jako NADES stosowano mieszaninę chlorku choliny i kwasu malonowego. Badania wykazały, że zastosowany roztwór eutektyczny zwiększył ilość wydzielonej chityny.

Chityna izolowana klasyczną metodą chemiczną była dodatkowo deacetylowana w celu otrzymania chitozanu. W pracy nie deacetylowano chityny izolowanej z wykorzystaniem NADES. Chityna izolowana nową „zieloną” metodą, w warunkach komercyjnych, byłaby i tak deacetylowana do chitozanu ze względu na to, że chitozan jest polimerem o wyższej aktywności, w tym również bioaktywności. Zatem interesującym byłoby porównanie własności (np. przeciwbakteryjne, cytotoksyczne) chitozanów izolowanych metodą klasyczną oraz nową metodą z NADES. Jednak Doktorantka takich badań nie wykonała.

Wyizolowane chityny oraz chitozany porównano z widmami FTIR komercyjnych polimerów wzorcowych. W widmach chityny izolowanych z pancerzy raka pręgowanego z wykorzystaniem NADES stwierdzono obecność dodatkowego pasma przy liczbie falowej 1414 cm^{-1} , które identyfikowano jako obecność białek w próbce. Porównując widma (rys. 1, publikacja 2), nie zamieszczono jednak widma użytego roztworu głęboko eutektycznego zatem nie można jednoznacznie stwierdzić czy dodatkowe pasmo pochodzi od białek czy też od użytego roztworu.

Przeprowadzono także analizę termogravimetryczną (TG) otrzymanych próbek chityny i chitozanu wykazując dwa główne etapy degradacji polimerów. Temperatury degradacji były nieznacznie niższe w porównaniu z polimerami wzorcowymi.

Przeprowadzono również obserwacje powierzchni cząstek chityny (SEM) otrzymanych nową metodą z pancerzy raka błotnego (rys. 5, publikacja 2) oraz chitozanów (rys. 6, publikacja 2) wyizolowanych z pancerzy obu raków. W pracy nie zamieszczono zdjęć chityny izolowanej z pancerzy raka pręgowanego ani zdjęć cząsteczek chityny otrzymanych metodą chemiczną. Nie można zatem stwierdzić czy pochodzenie oraz sposób izolacji ma wpływ na strukturę otrzymanych cząsteczek.

Porównując masę cząsteczkową chitozanów (HPSEC) izolowanych z pancerzy obu skorupiaków nie wykazano znacznych różnic, a jedynie niewielkie różnice w polidispersyjności. Przygotowując próbki do badań, chitozan był rozpuszczany w roztworze eluentu chromatograficznego, a następnie odwirowano i przefiltrowano otrzymany roztwór. Nasuwa się pytanie jaka część chitozanu uległa rozpuszczeniu, a jak została usunięta jako osad?? Nierozpuszczony osad to zazwyczaj polimer o wysokich i bardzo wysokich masach cząsteczkowych, który uległ samoistnemu sieciowaniu. W taki wypadek jest to część próbki, która nie była analizowana. Czy zastosowanie innego rozpuszczalnika w postaci samego kwasu octowego lub solnego pozwoliłoby na całkowite rozpuszczenie badanej próbki?

Ostatnim etapem badań było określenie działania antibakteryjnego i cytotoksyczności chitozanów otrzymanych z pancerzy badanych skorupiaków. Badanie działania antibakteryjnego przeprowadzono z wykorzystaniem bakterii gram ujemnych (*E. coli*) oraz bakterii gram dodatnich (*S. aureus*). Bakterie namnażano a następnie przygotowywano roztwór o określonej liczbie jtk/mL. W jaki sposób określano liczbę komórek w roztworze do badań?

Stwierdzono, że chitozan otrzymany z pancerzy raka błotnego wykazywał działanie bakteriostatyczne porównywalne do standardu chitozanu wobec *E. coli* oraz znacznie silniejsze działanie wobec *S. aureus*, zaś chitozan otrzymany z pancerzy raka pręgowanego wykazywał działanie bakteriostatyczne silniejsze niż komercyjny polimer jedynie w przypadku *S. aureus*. Natomiast oba chitozany wykazywały lepsze działanie bakteriobójcze niż chitozan komercyjny. Stwierdzono jednak, że dla obu chitozanów działanie bakteriobójcze i bakteriostatyczne było gorsze niż działanie antybiotyku (ampicylina).

Badania cytotoksyczności przeprowadzono z wykorzystaniem linii komórkowej nabłonka płuc A549. Wykazały one spadek żywotności komórek nabłonka wraz ze zwiększaniem stężenia chitozanu oraz czasu kontaktu. Dla najdłuższego badanego czasu kontaktu wynoszącego 48 godz. graniczne stężenie chitozanu wynosiło 250 µg/mL dla polimeru z pancerzy raka pręgowanego, natomiast chitozan z pancerzy raka błotnego był toksyczny w całym zakresie testowanych stężeń (15,6 – 500 µg/mL). Takie wyniki badań mogą budzić wątpliwości dotyczące możliwości wykorzystania chitozanów w zastosowaniach medycznych.

Trzecia z przedstawionych do oceny publikacji powtarza badania zaprezentowane w publikacji 2, z tym, że źródłem chityny były inne skorupiaki: kielż oraz lasonóg. Stwierdzić trzeba, że większość krytycznych uwag zaprezentowanych odnośnie publikacji 2 można odnieść także do publikacji 3. W przypadku tych skorupiaków zastosowanie NADES znacznie zwiększyło ilość wyizolowanej chityny (2.0-2,5 razy w przypadku kielży, oraz 6-6,5 razy w przypadku lasonogów).

W przeciwieństwie do wcześniejszych badań wykorzystujących pancerze raków, chitozan otrzymany z kielży wykazywał znacznie lepsze własności bakteriostatyczne i bakteriobójcze

niż chitozan komercyjny, jednak znacznie gorsze niż ampicylina. Nie zaprezentowano natomiast działania przeciwbakteryjnego chitozanu otrzymanego z łasonogów.

W przypadku cytotoksyczności stwierdzono, że chitozany otrzymane z pancerzy obu skorupiaków nie wykazywały działania cytotoksycznego względem komórek nabłonka płuc linii A549 po 48 godz. inkubacji, co dobrze rokuje możliwości wykorzystania tych polimerów w medycynie.

Stwierdzam, że badania zaprezentowane przez mgr Zofię Nuc potwierdzają postawione w pracy hipotezy badawcze, oraz że Doktorantka zrealizowała wyznaczone w pracy cele. Publikacje wchodzące w zakres rozprawy doktorskiej są publikacjami wieloautorskimi w których Doktorantka jest autorem korespondencyjnym.

Oceniając aspekty poznawcze rozprawy doktorskiej, za istotne osiągnięcia Doktorantki można uznać:

- zastosowany w pracy naturalny roztwór głęboko eutektyczny pozwolił na otrzymanie chityny z pancerzy skorupiaków wód polskich;
- przeprowadzono charakteryzację otrzymanej chityny pod kątem czystości polimeru i struktury jego cząsteczek;
- przeprowadzono charakteryzację chitozanu otrzymanego z chityny separowanej metodą chemiczną pod kątem czystości preparatu, rozkładu mas cząsteczkowych, struktury powierzchni cząsteczek;
- przeprowadzono charakteryzację biologiczną (działanie przeciwbakteryjne, cytotoksyczność) otrzymanych chitozanów.

W trakcie czytania pracy, oprócz wątpliwości przytoczonych powyżej, nasuwają się pytania mające na celu dyskusję zagadnień będących przedmiotem rozprawy.

1. Czy zastosowanie innego składu (inne proporcje) wykorzystywanego NADES mogłoby wpłynąć na ilość wydzielonej chityny.
2. Analizując dane literaturowe, jakie inne naturalne roztwory głęboko eutektyczne warto byłoby zastosować do ekstrakcji chityny z pancerzy skorupiaków?

Uwagi o charakterze edytorskim:

1. Należałoby zwrócić uwagę na dokładniejszą korektę tekstu polskiego.
2. Widma FTIR (rys. 1.) zamieszczone w publikacji 3 są na tyle małe i niewyraźne, że trudno ocenić prawidłowość wniosków wyciągniętych na ich podstawie.
3. Zdjęcia SEM powierzchni cząstek chityny (rys. 5.) zamieszczone w publikacji 3 nie precyzują, którą metodą izolowany był polimer.

Uwagi przedstawione powyżej, poczynione z obowiązku recenzenta, nie umniejszają wartości poznawczej rozprawy.

Wspomnieć także należy, że mgr Zofia Nuc odbyła 3 staże naukowe: dwa w Uniwersytecie w Pawii (Włochy) oraz jeden w Centro de Ciencias do Mar do Algarve w Faro (Portugalia).

3. Wniosek końcowy

Praca mgr Zofii Nuc wnosi wiele elementów nowości naukowej. Uzyskane wyniki poszerzają wiedzę na temat możliwości wykorzystania pancerzy innych skorupiaków niż krewetki czy kraby do otrzymywania chityny i chitozanu oraz wykorzystania naturalnych roztworów głęboko eutektycznych do ekstrakcji chityny.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska p. mgr Zofii Nuc spełnia wymagania formalne w odniesieniu do pracy doktorskiej, odpowiada wymogom ustawy o tytule i stopniach naukowych z dnia 20.07.2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce. Zwracam się, zatem do Rady Dyscypliny Nauki o Ziemi i Środowisku Uniwersytetu Gdańskiego o przyjęcie pracy oraz dopuszczenie p. mgr Zofii Nuc do dalszych etapów postępowania przewidzianego w przewodzie doktorskim.



dr hab. inż. Małgorzata Jaworska