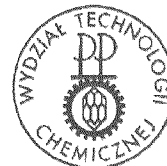




Dr hab. inż. Agnieszka Zgoła-Grześkowiak
Zakład Chemii Ogólnej i Analitycznej
Wydział Technologii Chemicznej
Politechnika Poznańska



Poznań, dnia 23 sierpnia 2016 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Eweliny Stelmach
„Określanie dostępności i przyswajalności wybranych pierwiastków w kawie z
zastosowaniem różnych metod rozdzielania oraz trawienia enzymatycznego” zrealizowanej
na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej
pod kierunkiem dr. hab. inż. Pawła Pohla, prof. PWR
oraz dr inż. Anny Szymczychy-Madei

Podstawa opracowania

Recenzja została opracowana na podstawie decyzji Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej z dnia 18 maja 2016 r.

Celowość podjęcia tematu

Kawa to jeden z głównych napoi często spożywanych na całym świecie. Jednakże, problem efektywnego wydzielania metali z kawy do jej naparów nie został jak dotąd szeroko opisany w literaturze. Brak jest również informacji na temat rodzaju form chemicznych metali występujących w naparach kawy oraz jakichkolwiek publikacji dotyczących przyswajalności tychże metali. Stąd podjęty zakres badań wydaje się być interesującym uzupełnieniem dotychczasowej wiedzy na temat kawy.

Charakterystyka i ocena pracy

Recenzowaną rozprawę doktorską stanowi zwarte opracowanie liczące 77 stron numerowanych oraz 6 publikacji na stronach nienumerowanych, których współautorką jest Doktorantka. Praca składa się z: wprowadzenia, celu pracy i metodyki badań, części teoretycznej obejmującej ogólne wiadomości na temat kawy, jej składu pierwiastkowego, wpływu oznaczanych przez Doktorantkę pierwiastków na zdrowie człowieka oraz informacji o specjacji metali, ich dostępności i przyswajalności w organizmie człowieka, ponadto z

bibliografii oraz części doświadczalnej składającej się z wprowadzenia do zbioru sześciu opublikowanych prac wraz z ich krótkim opisem oraz krótkiego końcowego podsumowania całości osiągnięć.

W części teoretycznej znajduje się dokładny opis kawy z uwzględnieniem obecnie uprawianych gatunków, ich smaku, wymaganego do uprawy klimatu i odporności na szkodniki. Dowiadujemy się, że ze względu na fakt, iż kawa spożywana jest pod każdą szerokością geograficzną, stanowi ona znaczącą gałąź gospodarki światowej. Pod względem wielkości i zysku rynek kawy jest na drugim miejscu po rynku petrochemicznym. Opisany został proces palenia kawy, zachodzące w trakcie jego prowadzenia reakcje oraz powstające produkty. Procesy wypalania ustalone są przez producentów, którzy wprowadzając odpowiednie zmiany, otrzymują ziarna palone o różnym aromacie z tego samego surowca. Na smak i aromat ma również wpływ dobór odpowiednich mieszanek kaw różnego pochodzenia.

Do niedawna kawa znana była głównie jako używka z uwagi na dużą zawartość kofeiny. Tymczasem Doktorantka opisuje obecny stan wiedzy na temat pozytywnego działania kawy, w tym aktywności przeciwutleniającej, co powoduje, że kawa zaczyna być uważana za tzw. żywność funkcjonalną. Wpływ na działanie kawy mogą mieć nie tylko zawarte w niej związki organiczne np. polifenole, ale także makro- i mikroelementy. Autorka prześledziła literaturę pod kątem składu pierwiastkowego ziaren oraz naparów kawy stwierdzając, iż w kawie oznaczono dotychczas ponad 50 różnych pierwiastków: makroelementów, mikroelementów i składników śladowych w tym toksycznych. Zawartości pierwiastków w ziarnach zielonych, palonych i naparach zebrane zostały w formie tabel z uwzględnieniem technik analitycznych stosowanych do oznaczeń.

Opisane zostało w skrócie przygotowanie próbek do pomiarów technikami spektralnymi w tym mineralizacja „na sucho” i „na mokro”. Autorka podała w formie tabelarycznej przykładowe procedury rozkładu ziaren i naparów kawy stosowane w oznaczaniu metali.

W dalszej części pracy przedstawiony został wpływ na zdrowie poszczególnych pierwiastków, których oznaczania podjęła się Doktorantka. Do pierwiastków tych należą makroelementy takie jak Ca i Mg oraz mikroelementy, tj. Fe, Mn, Cu i Zn. Poruszyła ona również problem specjacji w oznaczaniu pierwiastków.

Z uwagi na tematykę badawczą Autorki, dość szeroko opisane zostały zagadnienia dostępności i przyswajalności pierwiastków przez organizm człowieka. Określone zostały

czynniki wpływające na biodostępność metali, w tym rozpuszczalność w środowisku o różnym pH oraz wpływ matrycy. Opisane zostały również metody pozwalające na ocenę biodostępności, w tym eksperymenty *in vivo* i *in vitro*. Z uwagi na aspekty etyczne i wysokie koszty, testy *in vivo* są przeprowadzane stosunkowo rzadko. Obecny stan wiedzy i dostępna aparatura pozwalają na wykonanie testów *in vitro* dostarczających równie cennych informacji na temat biodostępności. Testy te symulują trawienie w jamie ustnej, żołądka i jelitach. Zostały one szeroko opisane przez Doktorantkę z uwagi na to, że stosowane są one w jej pracy badawczej.

Uwagi dotyczące części teoretycznej

- Na stronie 18 Doktorantka napisała, że w trakcie parzenia kawy „jedynie część całkowitego stężenia pierwiastków obecnych w ziarnie przechodzi do naparu” oraz „Dla kaw rozpuszczalnych z reguły przyjmuje się, że całkowita zawartość pierwiastka w naparze równa się jego stężeniu w produkcie stałym.” Zamienne stosowanie określeń stężenie i zawartość nie jest dopuszczalne. Nie można pisać o przechodzeniu stężenia z ziaren do naparu. Nie można również pisać o tym, że zawartość jest równa stężeniu. Tego typu sformułowania pojawiają się również w dalszej części pracy.
- W Tabeli 3 nie wyjaśniono skrótu FAEP, natomiast wyjaśniono skrót INAA, którego nie ma w tabeli – jest NAA. Z kolei w Tabeli 4 są oba skróty INAA i NAA. Wprowadzone skróty powinny być w odpowiedni sposób opisane i ujednolicone.
- Na stronie 23 napisano „Do najpopularniejszych metod instrumentalnych należą” zamiast „Do najpopularniejszych technik instrumentalnych należą”.
- Na stronie 23 pojawia się niefortunne sformułowanie „część autorów pracujących z ziarnami palonymi”.
- Niedopuszczalne jest stosowanie w bibliografii zapisu autorstwa publikacji w formie Kowalski i inni. Należy wymienić wszystkich współautorów.

Część doświadczalną stanowi zbiór 6 publikacji. Każda z nich poprzedzona jest krótkim streszczeniem w wersji polskiej i angielskiej oraz komentarzem opisującym główne zadania badawcze i uzyskane wyniki. Umieszczenie wersji angielskiej streszczenia jest niepotrzebnym powtórzeniem, gdyż jest ono zawarte w każdej z dołączonych publikacji. Lepsze byłoby podanie polskiej wersji tytułu pracy.

Pierwsza z prac obejmowała opracowanie prostej procedury służącej do oznaczania metali w naparach kaw techniką atomowej spektrometrii absorpcyjnej z atomizacją w płomieniu. Oznaczano Ca, Mg, Fe, Mn, Cu i Zn w naparach z kaw palonych. Na podstawie uzyskanych wyników dla ziaren i naparów wyznaczono stopień ługowania pierwiastków.

Uwagi dotyczące Publikacji nr 1

- Podane w komentarzu na stronie 50. sformułowanie „Precyzja pomiaru metodą FAAS była niższa niż 4%” jest niefortunne.
- W publikacji wyniki uzyskane dla makro- i mikroelementów są poprzepłatanne, co utrudnia ich szybką interpretację. Uwaga ta dotyczy również pozostałych publikacji.
- W Tabeli 2 stężenie w naparach wyrażone jest w $\mu\text{g/g}$ kawy użytej do zaparzania. Prowadzi to do niewłaściwego opisu w komentarzu na stronie 51., że stopień ekstrakcji metali z ziaren do naparu obliczono z ilorazu „stężenia metalu w naparze do stężenia w ziarnie mielonym”.
- W punkcie 2.3 publikacji znajduje się opis przygotowania próbek, w którym zastosowano uzupełnienie do objętości 10 ml w probówce z PP. Dlaczego nie stosowano kolb miarowych?
- Jaka była podstawa do wykonania naparów kaw w temperaturach 60 i 70°C?
- W pracy brakuje określenia odporności metody na obecność istotnych składników matrycy takich, jak np. potas i fosforany. Uwaga ta dotyczy także pozostałych prac.

Druga publikacja również dotyczyła porównania procedur przygotowania próbek naparów kaw. Jednakże, tym razem były to kawy rozpuszczalne. Oznaczono w naparach Ca, Mg, Mn i Fe. Ponadto wykonano frakcjonowanie chemiczne analizowanych naparów z wykorzystaniem ekstrakcji do fazy stałej.

Uwagi dotyczące Publikacji nr 2

- W komentarzu do pracy na stronie 54. znajdują się dwa skróty dla kolumnienek SPE: ODS-C18 i ODS-SCX. Proszę wyjaśnić, skąd wzięły się te skróty.
- W publikacji brakuje opisu obliczeń dla zawartości metali we frakcji hydrofobowej.
- W Tabeli 4 podano błędny zakres stężenia dla Ca oznaczanego w tejże publikacji.

- W Tabelach 5 i 6 wartości minimalne i maksymalne powinny być przedstawione w tej samej kolejności.
- W Tabeli 6 wartości minimalną, maksymalną, średnią i CV dla Mn w kolumnie RF skopiowano z Tabeli 5, tj. wpisano wartości dla Fe.

Publikacja nr 3 dotyczy tylko oznaczania Mn w naparach kawy mielonej oraz określenia jego dostępności na podstawie frakcjonowania chemicznego i fizycznego. Użyto do tego celu odpowiednio ekstrakcję do fazy stałej i ultrafiltrację membranową.

Uwagi dotyczące Publikacji nr 3

- W komentarzu na stronie 57. Autorka błędnie sugeruje wybór procedury E zamiast procedury D, jak to opisane zostało w publikacji.
- Ponownie błędnie zastosowano skrót ODS-SCX zarówno w publikacji jak i w komentarzu do niej.
- W komentarzu na stronie 57. napisano, że zastosowanie odpowiedniego połączenia kolumnenek SPE umożliwia wydzielenie frakcji hydrofobowej, kationowej i form pozostałych. Tymczasem frakcja hydrofobowa nie jest wydzielana lecz pozostaje na kolumnie i stężenie Mn w tej frakcji obliczane jest z różnicy stężeń w naparze i eluacie z kolumny DSC-18.
- W publikacji zastosowano zakwaszenie próbki przed analizą tłumacząc to koniecznością uniknięcia efektu pamięci w systemie wprowadzania próbek do spektrometru. Czy efekt ten był badany? W pracach nr 5 i 6 próbek nie zakwaszono pomimo stosowania takiego samego typu atomizera.
- Komentarz wprowadzający do pracy nr 3 zawiera opis próbek dla danych niepublikowanych, który jest inny niż zastosowany w publikacji. Uniemożliwia to porównanie i interpretację wyników dla różnych pierwiastków.

W Publikacji nr 4 na podstawie symulacji trawienia żołądkowo-jelitowego w warunkach *in vitro* oszacowano biodostępność Ca, Mg, Mn i Fe z naparów kaw mielonych. Zastosowano sztuczny sok żołądkowy na bazie pepsyny oraz jelitowy na bazie pankreatyny i soli żółciowej. Absorpcja metali przez kosmki jelitowe zasymulowana została przez ultrafiltrację z wykorzystaniem membrany o odciętej mas równej 3 kDa.

Uwagi dotyczące Publikacji nr 4

- W komentarzu na stronie 64. podano, że wyższe stężenia enzymów powodują obniżenie udziału frakcji biodostępnej Ca. Tymczasem podano dla pankreatyny najniższe i najwyższe stężenia.
- W komentarzu znajdują się dane niepublikowane dotyczące biodostępności metali z próbek stałych zmielonych ziaren kawy. Badania te dalekie są od powszechnie stosowanych sposobów konsumpcji kawy i tym samym niepotrzebne. Ponadto w schemacie tych badań zamiast ultrafiltracji stosuje się wirowanie, przy czym inna prędkość wirowania podana jest w tekście, a inna na schemacie (odpowiednio 12 tys. obr./min i 4 tys. obr./min).
- W publikacji w części dotyczącej aparatury jest podana wirówka, która nie była wykorzystana, co jest prawdopodobnie pozostałością po usuniętej części niepublikowanych badań dotyczących biodostępności metali z próbek stałych kawy.
- W Tabeli 1 zamienione zostały wyniki maksymalne z minimalnymi
- Niezrozumiałym jest zastosowanie membrany o odciętej mas 3 kDa, jeśli we wcześniejszej publikacji pokazano duży udział frakcji < 5kDa.

Publikacja nr 5 zawiera podobny zakres badań do Publikacji nr 4 z tą tylko różnicą, że dotyczy ona naparów kawy rozpuszczalnej. Ponadto zastosowano tu membranę o odciętej mas 5 kDa i w oznaczeniach użyto wysokorozdzielczą atomową spektrometrię absorpcyjną z atomizacją w płomieniu.

Uwagi dotyczące Publikacji nr 5

- Przy zastosowaniu tego samego typu atomizera, co w poprzednich pracach, niezrozumiałym jest brak konieczności zakwaszania próbki. Proszę o wyjaśnienie.
- Na stronie 70. komentarza na podstawie analizy wariancji stwierdzono, że kawy różnych producentów różnią się w sposób statystycznie istotny jedynie w przypadku stężenia manganu. Tymczasem w publikacji zapisane jest identyczne stwierdzenie, z tą tylko różnicą, że dotyczy ono stężenia magnezu. Proszę o wyjaśnienie, dla którego z pierwiastków to stwierdzenie jest prawdziwe.

Praca nr 6 dotyczy oznaczania metali oraz aktywności przeciwutleniającej w naparach kaw zielonych. Z uwagi na rosnącą popularność tego napoju, przeprowadzenie wykonanych badań jest w pełni uzasadnione. Podobnie jak w poprzedniej publikacji, zastosowano analizę bezpośrednią przygotowanych naparów. Sprawdzono również procedury przygotowania naparów oraz zbadano obecność korelacji pomiędzy zawartością wybranych metali, a aktywnością przeciwutleniającą naparów i zawartością polifenoli.

Uwagi dotyczące Publikacji nr 6

- W komentarzu na stronie 73. Autorka napisała „procedura odnośnikowa” zamiast „procedura odniesienia”.
- W komentarzu zamiast stężenia dla Cu podano stężenia Mn.
- Zamiast „silny dodatni związek” należy napisać „silna dodatnia zależność”.
- Proszę wyjaśnić, na czym polega chemiczne podobieństwo Cu i Fe opisane w komentarzu.
- W publikacji w procedurze przygotowania próbki podane są trzy różne ilości dodawanych kwasów azotowego i solnego stosowanych do zakwaszenia próbki przed analizą. Tymczasem w Tabeli 2 podano wyniki tylko dla 1 stężenia kwasu solnego.
- Niezrozumiałym jest, dlaczego w publikacji najpierw oznaczane są metale w kilkunastu naparach, a dopiero później testowany jest wpływ różnych parametrów zaparzania na ilości metali w naparach.

Biorąc pod uwagę wszystkie publikacje wchodzące w skład części doświadczalnej na uwagę zasługuje ogromny wkład pracy własnej mgr inż. Eweliny Stelmach. Opublikowane wyniki są wartościowe, znacząco poszerzają dotychczasowy stan wiedzy dotyczącej kawy i jej naparów ze szczególnym uwzględnieniem niepublikowanych dotąd informacji o dostępności wybranych przez Doktorantkę pierwiastków.

Niestety z obowiązku recenzenta muszę również wspomnieć, iż Autorka bardzo nieuważnie, a nawet niedbale przeprowadziła korektę edytorską tekstu rozprawy. W pracy znajdują się liczne błędy gramatyczne i językowe, które utrudniały lekturę dysertacji. Przykładowo: str. 27 „utrzymują równowagę zasadę kwasowo-zasadowo w organizmie”, str. 29 „ogrywa także rolę w stabilizacji”, str. 47 „w odróżnieniu do”, str. 48 „w kolejnych

podrozdziałach przedstawiono w pełnym brzemieniu” i wiele innych. Niemniej jednak nie zmniejszały one wartości naukowej przedstawionej pracy.

Podsumowanie

Recenzowana rozprawa charakteryzuje się dobrym poziomem naukowym i posiada dużą wartość poznawczą. Doktorantka przeprowadziła szereg badań, które opublikowane zostały w formie 6 publikacji w renomowanych czasopismach, dla których sumaryczny IF za rok 2015 równy jest 19,47. Ponadto, nadmienić trzeba, iż dorobek naukowy Doktorantki zawiera również 5 innych publikacji w czasopismach o międzynarodowym obiegu. Sumaryczna liczba cytowań prac wynosi 41, a indeks Hirscha dla opublikowanych prac równy jest 4, co świadczy o szerokim zainteresowaniu tematyką badawczą podjętą przez Doktorantkę.

Reasumując stwierdzam, iż przedstawiona przez Panią mgr inż. Ewelinę Stelmach rozprawa doktorska zatytułowana „Określanie dostępności i przyswajalności wybranych pierwiastków w kawie z zastosowaniem różnych metod rozdzielania oraz trawienia enzymatycznego” spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w ustawie z dnia 14.03.2003 r. (Dz. U. nr 65, poz. 595 z 2003 r. z późniejszymi zmianami). Zgodnie z zapisem tegoż aktu prawnego oceniana praca wskazuje na ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki w zakresie prowadzonych badań oraz zawiera elementy nowości naukowej. W związku z tym wnoszę o dopuszczenie mgr inż. Eweliny Stelmach do dalszych etapów przewodu doktorskiego. **Po wnikliwej ocenie rozprawy i dokonań naukowych Doktorantki wnioskuję ponadto o wyróżnienie recenzowanej pracy.**

A. Zgoda - Górecka