



Warszawa, 1.09.16

dr hab. Magdalena Biesaga
Wydział Chemii UW

Recenzja rozprawy doktorskiej **magister inżynier Eweliny Stelmach**
pt „**Określenie dostępności i przyswajalności wybranych pierwiastków
w kawie z zastosowaniem różnych metod rozdzielania oraz trawienia
enzymatycznego**”

Rozprawa doktorska mgr inż. Eweliny Stelmach wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Pawła Pohla oraz dr inż. Anny Szymczychy-Madei, dotyczy wykorzystania metody atomowej spektrometrii absorpcyjnej z atomizacją w płomieniu do oznaczania wybranych jonów metali w próbkach kawy i oszacowania dostępności i przyswajalności tych pierwiastków. Tematyka pracy podjęta przez Doktorantkę jest ciekawa, otrzymane wyniki powinny mieć duże znaczenie praktyczne, zwłaszcza, że dotyczą zagadnień związanych z żywieniem człowieka.

Rozprawa ma tzw. „nową formę” tzn. jest to zbiór sześciu prac trój autorskich, napisanych w języku angielskim (P1-P6), poprzedzony 46 stronicowym wstępem teoretycznym zawierającym 98 odnośników literaturowych. Druga część rozprawy zawiera oryginalne publikacje z lat 2013 - 2016. Podział treści prezentowanych w tej części rozprawy jest logiczny. Każda publikacja jest dodatkowo poprzedzona krótkim streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz komentarzem w języku polskim, w którym Autorka opisuje najważniejsze wyniki prac eksperymentalnych. W przypadku prac P3, P4 i P6 dołączone zostały wyniki eksperymentalne, które nie zostały opublikowane. Całość rozprawy kończy dwu stronicowe podsumowanie. W pracy umieszczono również oświadczenia wszystkich współautorów dotyczące ich wkładu pracy w poszczególne publikacje. Informacja ta pozwala recenzentowi uznać, iż rola doktorantki w większości publikacji była dominująca, w czterech pracach jest ona pierwszym Autorem.

Ponieważ materiał rozprawy jest oparty na publikacjach Doktorantki, które zostały już merytorycznie ocenione przez niezależnych recenzentów (wszystkie publikacje zostały opublikowane w czasopiśmie z tzw. listy



Filadelfijskiej o sumarycznym IF wynoszącym 19,504) moje zadanie jako recenzentki rozumiem jako przede wszystkim ocenę zakresu i tematyki prowadzonych badań. Dlatego w niniejszej recenzji skupiam się przede wszystkim na merytorycznej ocenie wstępu teoretycznego oraz komentarzy do publikacji.

Oceniając „wstęp teoretyczny” duże zdziwienie budzi sformułowany cel pracy, przedstawiony przez Autorkę na str. 5, który cytując dosłownie brzmi w sposób następujący: „pozyskanie wiedzy od grupach związków pierwiastków występujących w kawie, posiadających zbliżone pod względem fizykochemicznym własności, na drodze analizy frakcjonowanej naparów kawowych”. Jest on niezrozumiały i źle sformułowany, zwłaszcza biorąc pod uwagę tytuł rozprawy „Określenie dostępności i przyswajalności wybranych pierwiastków w kawie z zastosowaniem różnych metod rozdzielania oraz trawienia enzymatycznego”. Na szczęście w dalszych rozdziałach Autorka konsekwentnie realizuje temat swojej rozprawy nie zaś niejasno sformułowany cel. Czytając podsumowanie pracy można dojść do wniosku, że zdefiniowany w sposób niejasny cel pracy na stronie 5, jest jedynie wynikiem błędu językowego nie zaś merytorycznego. Autorce udało się w pracy oszacować poziom stężeń wybranych metali w naparach kawowych oraz ich biodostępność co wydaje się być pierwotnym celem dysertacji.

W dalszej części „wstępu teoretycznego” Autorka w sposób ciekawy i nie budzący wątpliwości omawia rodzaje kaw, różne sposoby ich przygotowania, skład chemiczny i metody oznaczania różnych pierwiastków w kawach zarówno w naparach jak i w suchych ziarnach. W tej części, p. mgr inż. Ewelina Stelmach zamieściła pięć Tabel. W Tabelach 2 oraz 3 używany jest niewyjaśniony skrót „ND”, choć można się domyślić, że ma on oznaczać „not detected”. Chemik analityk powinien jednak stosować bardziej poprawne określenie „poniżej granicy wykrywalności”.

W następnych rozdziałach Doktorantka omawia wpływ pierwiastków na zdrowie człowieka i uzasadnia wybór metali, które oznacza w części doświadczalnej opisanej w publikacjach. Ta część napisana jest bardzo zwięźle. W sposób jasny omówiona została rola tych pierwiastków oraz formy w jakich występują w organizmie człowieka, a także główne źródła tych pierwiastków w diecie.

Kolejny rozdział poświęcony jest ogólnie specjacji pierwiastków i wymienione zostały metody badań specjacji. W tej części zabrakło mi trochę szerszego ujęcia analizy frakcyjnej z uwzględnieniem dwóch technik



stosowanych w pracach własnych tzn. ekstrakcji do fazy stałej i filtracji membranowej.

Ostatni rozdział „wstępu teoretycznego” poświęcony jest dostępności i przyswajalności pierwiastków w organizmie ludzkim. Autorka definiuje biodostępność jako stosunek stężenia składnika możliwego do pobrania przez organizm do stężenia składnika w badanym produkcie. Na użytek przedstawionych prac jest to dobry wskaźnik, choć warto pamiętać, że w pracach poświęconych metabolizmowi istnieją inne sposoby oznaczania biodostępności. Niewątpliwie najciekawszym fragmentem tej części jest rozdział o badaniach *in vitro* biodostępności, w którym Doktorantka omawia szczegółowo zagadnienia związane z symulacją trawienia żołądkowego i jelitowego.

Podsumowując tę część pracy uważam, że jest ona logiczna i spójna pod względem merytorycznym. Jednak występują w niej nieliczne błędy językowe np. na stronie 6 „Finlandczycy”, na stronie 34 „dyfuzja ułatwiona”, czy też stosowanie zwrotu „ilość pomiarów” zamiast poprawnego określenia „liczba pomiarów”.

Na uwagę krytyczną zasługuje natomiast sposób prezentowania Bibliografii. W niektórych pozycjach literaturowych Doktorantka podaje nazwiska wszystkich współautorów w innych tylko pierwszego. Ten ostatni sposób jest dopuszczalny w przypadku cytowania pracy w tekście, ale w Bibliografii powinni być wymienieni wszyscy współautorzy.

Analizując dorobek naukowy Doktorantki zawarty w pracach od P1 do P6 szczególnie zwraca uwagę duża liczba wykonanych analiz. Pani mgr inż. Ewelina Stelmach oznaczała stężenia pierwiastków z grupy makroelementów (Ca i Mg) oraz z grupy mikroelementów (Fe, Cu, Zn i Mn) w naparach kaw ziarnistych - Praca 1 oraz w kawach rozpuszczalnych - Praca 2, w kawach zielonych - P6. W tych pracach Autorka określiła wpływ rodzaju zaparzania kawy, temperatury wody, rodzaju wody, czasu parzenia na efektywność ekstrakcji wybranych pierwiastków. Na podstawie otrzymanych wyników do dalszych badań Doktorantka wybrała wodę dwu-krotnie destylowaną. Ma to o tyle mało praktyczne znaczenia, że konsumenci kawy do zaparzania wykorzystują wodę kranową. Zatem rozważania związane z biodostępnością wytypowanych pierwiastków są dalekie od rzeczywistych naparów wypijanych przez ludzi. Zaburzenie równowagi chemicznej poprzez wprowadzenie rozpuszczalnika zawierającego dany pierwiastek powoduje, że tak jak np. w przypadku jonów Ca nie będzie on występował w naparze kawy. Doktorantka spadek stężenia wapnia w naparze tłumaczy silnym wiązaniem tego



pierwiastka przez polifenole lub inne związki obecne w matrycy. Z nieopublikowanych badań dołączonych do pracy P3 wynika, że wapń znajduje się w dwóch frakcjach hydrofobowych: 5 kDa (około 50 - 60%) oraz 5-10 kDa (20 - 40 %). Podobne wyniki, opisane w Pracy P3, otrzymała Autorka dla jonów Mg. Niestety Doktorantka nie wyjaśnia jednak jakie konkretne związki wapnia i magnezu dominują w tych frakcjach, zwłaszcza we frakcji 5-10 kDa oraz jak mogą one się łączyć z jonami metalu. Odpowiedzi na te pytania wydają się być istotne dla zrozumienia biodostępności tych pierwiastków.

Autorka w swoich badaniach jako metodę sprawdzenia dokładności metod wykorzystwała dodatek wzorca, gdyż jak napisała nie istnieje certyfikowany materiałem referencyjny dla kawy. Szkoda, że w ani jednym przypadku nie zostały podjęte oznaczenia zawartości wybranych pierwiastków w materiale referencyjnym o równie skomplikowanej matrycy np herbacie, ziołach, orzechach. Taka analiza pozwoliłaby w sposób jednoznaczny zweryfikować opracowane metody.

Badania biodostępności naparów kawy, opisane w pracach P4 i P5, prowadzone były dla naparów na bazie wody re-destylowanej co jak napisałam wcześniej odbiega daleko od rzeczywistych warunków i pozwala tylko na teoretyczne rozważania. W nieopublikowanych danych eksperymentalnych przedstawiono również wyniki trawienia żołądkowo-jelitowego suchych ziaren kawy. Jeśli jednym z celów pracy było pogłębienie wiedzy o biodostępności wybranych pierwiastków w kawie, to przydatność praktyczna takich badań jest minimalna, gdyż odbiega daleko od rzeczywistych warunków konsumpcji kawy.

W pracy P6 Doktorantka wyznaczyła zawartość wybranych pierwiastków naparach i ziarnach kaw zielonych. Oznaczyła również aktywność antyutleniającą (metoda z rodnikiem DPPH) i jak napisała całkowitą zawartość polifenoli przy wykorzystaniu metody Folina-Ciocalteu badanych próbek.

Metoda oparta o procent neutralizacji rodnika DPPH określa zdolności antyutleniające próbki. Wpływ na wynik ma zarówno środowisko prowadzenia analizy (np. pH, stężenie jonów metali przejściowych, obecność polifenoli), jak również początkowe stężenie rodnika.

Podobnie metoda Folin-Ciocalteu, nazywana często błędnie w literaturze „metodą oznaczania całkowitej ilości polifenolowych w próbce”, pozwala jedynie na oznaczenie właściwości redukujących próbki. W metodzie tej wiele związków takich jak: cukry redukujące, aminy, tiole, kwas askorbinowy, niektóre kwasy organiczne, alkohole wielowodorotlenowe oraz



jony żelaza, manganu i miedzi powoduje liczne interferencje. Nie rozumiem zatem po co wyznaczać korelacje z czynnikami przeszkadzającymi w wykonaniu oznaczenia o czym dobrze wiadomo z danych literaturowych. Z zaprezentowanych danych w Tabeli 5 w pracy P6, widać różnice w zdolnościach antyutleniających badanych naparów wyznaczonych obydwoma metodami. W pracy zabrakło porównania wyników otrzymanych tymi metodami i podjęcia próby wyjaśnienia tych różnic. Zastosowanie metod statystycznych, np. analiza głównych składowych, mogłoby wyjaśnić czy obserwowane różnice w uszeregowaniu poszczególnych naparów pod kątem zdolności antyutleniających jest rzeczywiście statystycznie istotne.

W przedstawionej pracy zabrakło informacji o innym dorobku naukowym Doktorantki takim jak wystąpienia konferencyjne oraz odbyte staże naukowe.

Podsumowując chciałabym podkreślić, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska p. mgr inż. Eweliny Stelmach prezentuje wysoki poziom. Na szczególną uwagę zasługuje sposób opracowania wyników z uwzględnieniem metod statystycznych oraz badania metabolizmu *in vitro*. Praca wnosi niewątpliwy wkład do lepszego poznania zagadnień związanych z metabolizmem *in vitro* oraz określeniem biodostępności Ca, Mg, Cu, Mn, Fe, Zn w naparach kawy. Przedstawione wcześniej krytyczne uwagi i zastrzeżenia pozwolą, mam nadzieję, unikać Autorce w przyszłości podobnych, drobnych niedociągnięć i nie umniejszają mojej pozytywnej oceny opiniowanej dysertacji.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa mgr inż Eweliny Stelmach spełnia wymagania ustawowe stawiane rozprawom doktorskim przez Ustawę o Stopniach i Tytułach Naukowych z dnia 14 marca 2003 roku i wnoszę o dopuszczenie Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

MPiel