

Streszczenie rozprawy doktorskiej

mgr inż. Eweliny Stelmach

pt. „Określenie dostępności i przyswajalności pierwiastków z kawy z zastosowaniem różnych metod rozdzielania oraz trawienia enzymatycznego”.

Promotor: dr hab. inż. Paweł Pohl, prof. PWR

Promotor pomocniczy: dr inż. Anna Szymczycha-Madeja

Kawa, zaraz po wodzie pitnej i herbacie, to jeden z najpopularniejszych napojów na świecie. Spożywana głównie ze względu na smak oraz właściwości pobudzające, posiada również właściwości prozdrowotne. Oprócz bioaktywnych komponentów, np. polifenoli, kwasów chlorogenowych czy kofeiny, w jej składzie znajduje się również szereg składników mineralnych. Od kilku lat analiza pierwiastkowa kaw cieszy się coraz większym zainteresowaniem, m.in. z uwagi na jej użyteczność w określaniu pochodzenia geograficznego ziaren.

W niniejszej rozprawie doktorskiej podjęto tematykę związaną z określeniem dostępności i przyswajalnością pierwiastków. Ze względu na zjawisko specjacji tj. występowanie pierwiastków w badanym produkcie w postaci różnych form fizykochemicznych, najbardziej powszechne w literaturze opieranie się jedynie na ogólnej informacji dotyczącej całkowitego stężenia pierwiastka w produkcie prowadzić może do niewłaściwej oceny wpływu jego spożycia na zdrowie człowieka. Celem niniejszej pracy jest pozyskanie użytecznej wiedzy na temat pierwiastków obecnych w naparach poprzez wyznaczenie występujących w kawie grup związków Ca, Cu, Fe, Mg, Mn i Zn posiadających zbliżone właściwości fizykochemiczne oraz określenie w jaki sposób mogą być one dostępne i możliwe do pobrania przez organizm po spożyciu naparu.

Do realizacji postawionych zamierzeń zastosowana została analiza frakcjonowana kaw (chemiczna oraz fizyczna) w celu określenia udziału frakcji dostępnej pierwiastków, a także symulacja trawienia żołądkowo-jelitowego w warunkach *in vitro* w celu określenia frakcji przyswajalnej (tzw. biodostępnej). W badaniach wykorzystano próbki naturalnych kaw palonych oraz kaw rozpuszczalnych dostępnych komercyjnie. W rozprawie opracowano oraz zoptymalizowano szybkie i proste metody przygotowania próbek naparów do pomiaru metodą atomowej spektrometrii absorpcyjnej z atomizacją w płomieniu (ang. F AAS) bez konieczności ich mineralizacji. Wyniki przeprowadzonych prac przedstawiono w postaci spójnego zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych. Dla części prac przedstawiono również materiały nieopublikowane (Praca nr 3, Praca nr 4, Praca nr 6).

W toku przeprowadzonych badań wykazano, że pierwszym etapem warunkującym biodostępność metali z naparów kaw palonych oraz zielonych jest ich przygotowanie (Praca nr 1, Praca nr 6). W zależności od rodzaju ziarna i analizowanego pierwiastka, stopień wylugowania może wahać się od kilku do ok. 50% jego stężenia w produkcie stałym. W przypadku kaw rozpuszczalnych stężenie w produkcie stałym oraz wykonanym z niego naparze jest tożsame (Praca nr 2).

Wykonanie analizy frakcjonowanej kaw mielonych pozwoliło zaobserwować znaczne zróżnicowanie między dostępnością Ca i Mg z różnych próbek. Dla Mn określono, że dominującymi frakcjami fizycznymi są frakcje <10 kDa, zaś dominującą frakcją chemiczną – frakcja kationowa (Praca nr 3). Z kolei w naparach kawy rozpuszczalnej Ca, Mg i Mn są obecne przede wszystkim w postaci frakcji kationowej i frakcji fizycznej <5 kDa, a więc w formach uważanych za najbardziej ruchliwe i najłatwiejsze do pobrania przez organizm. Świadczy to o wysokiej dostępności tych metali (Praca nr 4).

Dla Fe zarówno w naparach kawy mielonej, jak i rozpuszczalnej, zaobserwowano większy niż dla innych metali udział frakcji form obojętnych. Wpływa to na zmniejszenie dostępności Fe, a w konsekwencji również przyswajalności (Praca nr 3, Praca nr 4). Ze względu na zbyt niskie stężenia Cu i Zn, wyznaczenie w ich przypadku udziału poszczególnych frakcji w sposób wiarygodny, bez zastosowania dodatkowych etapów procesu analitycznego, nie było możliwe.

W wyniku przeprowadzonych symulacji trawienia żołądkowo-jelitowego określono, że najbardziej biodostępnymi metalami są Mg i Ca, co potwierdza wyniki uzyskane po zastosowaniu frakcjonowania chemicznego i fizycznego (Praca nr 4, Praca nr 5). Podobnie, w przypadku Fe, niski udział frakcji kationowej w naparach kaw rozpuszczalnych mógł być związany z niższym udziałem frakcji biodostępnej pierwiastka (Praca nr 4, Praca nr 5). Dla Mn zaobserwowano, że mimo obecności w wyjściowej próbce dostępnych form fizycznych i chemicznych tego pierwiastka, frakcja przyswajalna była znacznie niższa. Oznacza to, że symulacja procesów trawiennych wpływała na obniżenie udziału frakcji biodostępnej, co może mieć związek z obecnością w matrycy substancji odpowiedzialnych za wiązanie Mn (Praca nr 4, Praca nr 5).

Biorąc pod uwagę wyniki analizy frakcjonowanej, wyznaczony udział frakcji przyswajalnej, a także dodatkowo niski stopień lugowania Cu i Zn z ziaren do gotowego napoju, należy zatem ocenić, że napary kawy palonej i rozpuszczalnej nie są istotnym

źródłem badanych pierwiastków w diecie człowieka. Znaczna biodostępność Ca i Mg może jednak przyczynić się do stymulacji pozytywnego działania napoju na organizm.

Opracowane w ramach realizacji pracy proste i szybkie metody przygotowania próbek naparów kaw do pomiaru zawartości pierwiastków metodą F AAS (Praca nr 1, Praca nr 2, Praca nr 6), pozwoliły na znaczne zredukowanie kosztów oraz czasu niezbędnego na wykonanie analiz, co jest bardzo istotne w przypadku badania znacznej liczby próbek. Opisany sposób wyznaczania frakcji dostępnej oraz przyswajalnej może zostać w przyszłości wykorzystany także do analizy innych produktów żywnościowych.

Zestawienie prac składających się na rozprawę:

1. Praca nr 1: **The suitability of the simplified method of the analysis of coffee infusions on the content of Ca, Cu, Fe, Mg, Mn and Zn and the study of the effect of preparation conditions on the leachability of elements into the coffee brew**
Autorzy: Ewelina Stelmach, Paweł Pohl, Anna Szymczycha-Madeja
Czasopismo: Food Chemistry 141 (2013), strony: 1956–1961
2. Praca nr 2: **Simplified sample treatment for the determination of total concentrations and chemical fractionation forms of Ca, Fe, Mg and Mn in soluble coffees**
Autorzy: Paweł Pohl, Ewelina Stelmach, Anna Szymczycha-Madeja
Czasopismo: Food Chemistry 163 (2014), strony: 31–36
3. Praca nr 3: **Determination of total concentrations and chemical and physical fractionation forms of manganese in infusions of natural ground coffees**
Autorzy: Paweł Pohl, Ewelina Stelmach, Anna Szymczycha-Madeja
Czasopismo: Food Analytical Methods 7(2014), strony: 676–682
4. Praca nr 4: **Evaluation of the bioaccessability of Ca, Fe, Mg and Mn in ground coffee infusions by in vitro gastrointestinal digestion**
Autorzy: Ewelina Stelmach, Paweł Pohl, Anna Szymczycha-Madeja
Czasopismo: Journal of Brazilian Chemical Society 11 (2014), strony: 1993-1999
5. Praca nr 5: **A simplified determination of total concentrations of Ca, Fe, Mg and Mn in addition to their bioaccessible fraction in popular instant coffee brews**
Autorzy: Ewelina Stelmach, Paweł Pohl, Anna Szymczycha-Madeja
Czasopismo: Food Chemistry 197 (2016), strony: 388-394
6. Praca nr 6: **The content of Ca, Cu, Fe, Mg and Mn and antioxidant activity of green coffee brews**
Autorzy: Ewelina Stelmach, Paweł Pohl, Anna Szymczycha-Madeja
Czasopismo: Food Chemistry 182 (2015), strony: 302–308

A summary of doctoral dissertation of

M. Sc. Eng. Ewelina Stelmach

entitled "Determination of accessibility and bio accessibility of the elements of coffee using various separation methods and the enzymatic digestion".

Supervisor: PhD, Eng. Paweł Pohl, prof. PWr

Co-supervisor: PhD, Eng. Anna Szymczycha-Madeja

Coffee, right after water and tea, is one of the most popular drinks in the world. It is consumed mainly because of its flavour and stimulant effect, but may also provide a health-related activity. Beside bioactive components, e.g. polyphenols, chlorogenic acids or caffeine, it also contains a number of minerals. Recently, elemental analyses of coffee are more and more popular, mainly because of their usefulness in discrimination of geographical origin of coffee beans.

The main issue of the presented doctoral dissertation is determination of accessibility (availability) and bioaccessibility of elements. Due to chemical speciation, i.e. an occurrence of elements in form of different species in the analysed material, valuation of the bioaccessibility basing only on the total concentration of elements in food, can lead to an improper evaluation of the final effect of the consumption on human health. The aim of this work is to acquire useful knowledge about elements present in coffee infusion by identifying groups of compounds of Ca, Cu, Fe, Mg, Mn and Zn with similar properties. The results were then used to evaluate accessibility and rate of potential assimilation of each element.

The methodology used to conduct experiments was based on: the use of fractionation analyses (chemical and physical) in case of describing accessibility of the elements and simulation of gastrointestinal digestion in in vitro conditions to determine the bioaccessibility fraction. For analysis purposes a selection of commercially available samples of natural roasted coffees and instant coffees was used. Fast and simple methods for preparing infusions used determination of the elemental content by atomic absorption spectrometry with atomization in flame (F AAS), excluding need of a mineralisation, were proposed and optimized. Presented doctoral dissertation is prepared in a form of consistent set of articles published in a scientific literature. For few of them also unpublished materials were presented (Article nr 3, Article nr 4, Article nr 6).

Studies have shown that the first stage to condition bioaccessibility of metals is the preparation stage, in which infusions are prepared from roasted and ground coffees or from green beans (Article nr 1, Article nr 6). Depending on the kind of beans and analysed element, extraction rate from beans to infusion can vary from few up to 50% of a metal concentration in a solid sample. In case of instant coffees, concentration of elements in solid samples and their infusions was on the same level (Article nr 2).

Considering results of fractionation analyses of roasted coffees, there was a significant differentiation between different samples' potential accessibility of Ca and Mg, while both Ca and Mg can be considered accessible – they were predominant in cationic or hydrofobic form and in fraction <5kDa. For Mn the predominant fractions were: <10 kDa (physical fraction) and cationic (chemical fraction) (Article nr 3). Regarding instant coffees it was found, that Ca, Mg and Mn are present in infusions mainly as a cationic and <5 kDa fraction, thus they can be considered most mobile and easily absorbable by the organism (Article nr 4).

In case of Fe, both in roasted and instant coffee infusions, a major content of residual fraction was observed (comparing to the other metals). It results in a decrease of Fe accessibility and as a consequence also its bioaccessibility (Article nr 3, Article nr 4). For Cu and Zn it was impossible to select fractionation pattern without additional analytical procedures, because of their concentration on a very low level.

Simulations of a gastrointestinal digestion confirmed high bioaccessibility of Mg and Ca from coffee infusions (Article nr 4, Article nr 5). For Fe results of chemical fractionation and simulated digestion also were consistent – they show low bioaccessibility of that element (Article nr 4, Article nr 5). Unfortunately, for Mn there were differences between potential accessibility and bioaccessibility – it was shown that a simulated digestion procedure results for Mn in a lower content of bioavailable fraction comparing to previously described accessible concentration. It can be connected with organic compounds in coffee matrix, which are able to bind Mn (Article nr 4, Article nr 5).

Taking into account all above mentioned results and also considering very low leaching percentages of Zn and Cu from beans to infusion, it can be stated, that mean daily consumption of coffee infusion cannot be considered as a substantial source of the analyzed elements in human diet. However, high bioaccessibility of Ca and Mg can be correlated with a positive effect of coffee on human health.

Simple and fast methods for preparation of coffee infusions (Article nr 1, Article nr 2, Article nr 6) used in measurements of elemental concentration by the F AAS method serve as a useful tool for analysis of a number of samples. Proposed method of selecting accessibility and bioaccessibility fractions can be also used in future for analysis of other food products.

The dissertation consists of following articles:

1. Article nr 1: **The suitability of the simplified method of the analysis of coffee infusions on the content of Ca, Cu, Fe, Mg, Mn and Zn and the study of the effect of preparation conditions on the leachability of elements into the coffee brew**
Authors: Ewelina Stelmach, Pawel Pohl, Anna Szymczycha-Madeja
Journal: Food Chemistry 141 (2013), pages: 1956–1961
2. Article nr 2: **Simplified sample treatment for the determination of total concentrations and chemical fractionation forms of Ca, Fe, Mg and Mn in soluble coffees**
Authors: Paweł Pohl, Ewelina Stelmach, Anna Szymczycha-Madeja
Journal: Food Chemistry 163 (2014), pages: 31–36
3. Article nr 3: **Determination of total concentrations and chemical and physical fractionation forms of manganese in infusions of natural ground coffees**
Authors: Pawel Pohl, Ewelina Stelmach, Anna Szymczycha-Madeja
Journal: Food Analytical Methods 7(2014), pages: 676–682
4. Article nr 4: **Evaluation of the bioaccessability of Ca, Fe, Mg and Mn in ground coffee infusions by in vitro gastrointestinal digestion**
Authors: Ewelina Stelmach, Paweł Pohl, Anna Szymczycha-Madeja
Journal: Journal of Brazilian Chemical Society 11 (2014), pages: 1993-1999
5. Article nr 5: **A simplified determination of total concentrations of Ca, Fe, Mg and Mn in addition to their bioaccessible fraction in popular instant coffee brews**
Authors: Ewelina Stelmach, Paweł Pohl, Anna Szymczycha-Madeja
Journal: Food Chemistry 197 (2016), pages: 388-394
6. Article nr 6: **The content of Ca, Cu, Fe, Mg and Mn and antioxidant activity of green coffee brews**
Authors: Ewelina Stelmach, Pawel Pohl, Anna Szymczycha-Madeja
Journal: Food Chemistry 182 (2015), pages: 302–308