

Olsztyn, 13.08.2017 r.

Prof. dr hab. Henryk Zieliński  
Zakład Chemii i Biodynamiki Żywności  
Oddział Nauk o Żywności  
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności  
Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie  
Tel.: 89 523 4682 (795 985 825)  
Fax: 89 524 0124  
e-mail: [h.zielinski@pan.olsztyn.pl](mailto:h.zielinski@pan.olsztyn.pl)

#### RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Agaty Durak-Dados pt. „Interakcje bioaktywnych składników kawy i wybranych dodatków funkcjonalnych jako czynnik modyfikujący potencjalną aktywność biologiczną”  
wykonanej w Katedrze Biochemii i Chemii Żywności na Wydziale Nauk o Żywności i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie,  
pod kierunkiem Pani dr hab. Urszuli Gawlik-Dziki, prof. nadzw. UP i promotora pomocniczego Pana dr hab. Michała Świecy

Recenzja została wykonana w oparciu o uchwałę Rady Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie podjętej w dniu 29 października 2014 roku, zgodnie z wymaganiami art. 20 ust. 5 Ustawy z 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003, Nr 65, poz. 595 z póź. zm.).

Podstawę rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Agaty Durak-Dados pt. „Interakcje bioaktywnych składników kawy i wybranych dodatków funkcjonalnych jako czynnik modyfikujący potencjalną aktywność biologiczną”, stanowi zbiór 4 opublikowanych prac w latach 2014-2017 w czasopismach indeksowanych w Journal Citation Reports:

- I. Durak A., Gawlik-Dziki U., Pecio L. Coffee with cinnamon – impact of phytochemicals interactions on antioxidant and anti-inflammatory *in vitro* activity. Food Chemistry, 2014, 162, 81-88 (IF = 3,391).
- II. Durak A., Gawlik-Dziki U., Kowalska I. Coffee with ginger – interactions of biologically active phytochemicals in the model system. Food Chemistry, 2014, 166, 261-269 (IF = 4,052).
- III. Durak A., Gawlik-Dziki U., Kowalska I. Evaluation of interactions between coffee and cardamon, their type, and strength in relations to interactions in a model system. CyTA – Journal of Food, 2017, 15 (2), 266-276 (IF = 1,180).
- IV. Durak A., Kowalska I., Gawlik-Dziki U. UPLC-MS method for determination of phenolic compounds in chili as a coffee supplement and their impact of phytochemicals interactions on antioxidant activity in vitro. Acta Chromatographica, 2017, <http://www.akademia.com/doi/abs/10.1556/1326.2016.00173> (IF = 0,755).

Udział Kandydatki w ich powstawaniu (zgodnie z załączonymi oświadczeniami współautorów) wynosi 70-80%. Podkreślam zatem bardzo duży indywidualny wkład Pani mgr inż. Agaty Durak-Dados w powstanie ww. zbioru publikacji. Ranga czasopism, w których prace zostały opublikowane, nie pozostawia wątpliwości co do wysokiego poziomu naukowego i warsztatowego Kandydatki. Trzeba zaznaczyć, że przedłożona rozprawa oprócz 4 ww. publikacji, zawiera także wstęp – przedstawienie aktualnego stanu wiedzy dotyczącej poruszanych problemów, cel badań, omówienie zastosowanych metod oraz syntetyczne omówienie wyników wraz z dyskusją. Praca podsumowana jest pięcioma wnioskami. Całość uzupełnia streszczenie w języku polskim i angielskim.

Problematyka podjęta przez Doktorantkę obejmuje szereg zagadnień związanych z chemią żywności, analityką i żywnością funkcjonalną obejmującą kawę jako napar wzbogacony w wybrane przyprawy w celu poprawy jej smaku, aromatu, a także potencjalnych właściwości prozdrowotnych. Tematyka wolnych rodników i związków fenolowych jako naturalnych przeciwutleniaczy, ich przemian metabolicznych i aktywności

biologicznej ma charakter bardzo interdyscyplinarny, tym bardziej kiedy dotyczy właśnie kawy i przypraw. Zajmuje ona ważne miejsce nie tylko w obszarze chemii, medycyny i biologii, ale również w nauce o żywności, która wnosi wiele istotnych informacji o możliwości redukcji stresu oksydacyjnego lub karbonylowego a dalej ograniczenia ryzyka zapadalności na tzw. choroby cywilizacyjne. Ta tematyka jeszcze przez wiele lat będzie wiodąca albowiem interakcje reaktywnych form tlenu i azotu prowadzą do powstania nowych reaktywnych form a z kolei nieuzasadnione stosowanie nadmiernych ilości przeciwutleniaczy może prowadzić również do stresu redukcyjnego z konsekwencją zaburzenia homeostazy organizmu konsumenta. W tym miejscu chciałbym pogratulować Doktorantce oraz Pani promotor jak i Panu promotorowi pomocniczego za odwagę badawczą w dziedzinie żywności funkcjonalnej obejmującej kawę we wszystkich jej aspektach. Każdego ranka miliony ludzi zaczynają dzień filiżanką kawy. Obecnie jest to jeden z najpopularniejszych napojów na świecie. Z końcem XX wieku kawa była drugim, po ropie naftowej, najczęściej eksportowanym surowcem na świecie. Szacunkowo, każdego dnia wypijano 2,25 miliarda filiżanek. Trudno się zatem temu dziwić, że kawa zyskała rzesze zwolenników głównie dzięki swojemu ożywcemu i pobudzającemu działaniu na organizm. Tak wielka jej popularność spowodowała wzrost zainteresowania, nie tylko sposobami jej przyrządzania, ale również badaniami nad składem ziaren oraz wpływem na zdrowie i życie człowieka. Kawa ma również swoich przeciwników. Co prawda są oni w mniejszości, jednakże zarówno zwolennicy jak i przeciwnicy nie są pozbawieni swoich racji co bardzo dobrze dokumentuje praca przeglądowa pt. „A Comprehensive Overview of the Risks and Benefits of Coffee Consumption” opublikowana w *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (2016, 15, 671-684). W pracy tej spośród 12405 artykułów dotyczących kawy opublikowanych od roku 1970 wyselekcjonowano 127 pozycji obejmujących badania kliniczne, które jednoznacznie wskazują zarówno na korzyści ale i na ryzyko związane z piciem kawy.

W przedstawionej rozprawie doktorskiej Doktorantka najpierw skupiła się na określeniu profilu polifenolowego kawy palonej Arabica i wybranych przypraw (cynamon, imbir, kardamon i chili) jako dodatków funkcjonalnych i ich wielokierunkowych właściwości przeciwutleniających. Następnie podjęła próbę określenia rodzaju interakcji substancji biologicznie czynnych w naparach w zróżnicowanych stosunkach objętościowych. Tak więc na jednym biegunie Doktorantka badała model kawy wzbogaconej przyprawami w kombinacjach 4:1, 3:2 i 1:1 (v/v), na drugim zaś model przypraw wzbogacony kawą. O rzeczywistej wartości związków polifenolowych w kawie suplementowanej badanymi

przyprawami decyduje ich biopodatność, którą Doktorantka badała w układzie modelu trawienia *in vitro*, uwzględniającym przemiany i interakcje tych związków na skutek przemieszczania się w układzie pokarmowym do momentu ich wchłonięcia do obiegu krwi i dalszego ich metabolizmem w organizmie. W celach porównawczych zastosowała ponadto układ modelowy zawierający czyste chemicznie wzorce zidentyfikowane jako dominujące związki fenolowe w ekstraktach kawy i badanych przypraw.

Na podkreślenie zasługuje zastosowany warsztat badawczy Doktorantki, który rozwijając się wraz z kolejnymi publikacjami obejmował techniki chromatograficzne wraz ze spektrometrią mas oraz techniki spektrofotometryczne służące usystematyzowanemu badaniu pojemności antyoksydacyjnej, wyznaczonej *in vitro* na podstawie wymiatania trwałych i nie występujących w przyrodzie wolnych rodników (ABTS<sup>•+</sup>), reaktywnych form tlenu o kluczowym znaczeniu biologicznym (anionorodnik ponadtlenkowy, rodnik hydroksylowy), zdolności redukującej i chelatującej oraz badaniu hamowania aktywności enzymów prooksydacyjnych takich jak lipooksygenaza i oksydaza ksantynowa. Za szczególnie cenne uważam zastosowanie analizy izobolograficznej i wyznaczanie współczynników interakcji do oceny rodzaju interakcji pomiędzy składnikami kawy i poszczególnych przypraw. Współczynniki interakcji naparu kawy i badanych przypraw zostały wyznaczone dla kombinacji objętościowej 1:1 (v/v).

Doktorantka zidentyfikowała w naparze z kawy palonej kilkanaście związków fenolowych, głównie były to związki z grupy kwasów hydroksycynamonowych. W najwyższym stężeniu w naparze z kawy palonej występowały kwasy chlorogenowe a więc estry powstałe z kwasu chinowego i kwasu kawowego. Dominującym ilościowo w badanym naparze kawy był kwas 3- O – dikawoilochinowy a następnie kwas 5- O – dikawoilochinowy choć ten ostatni został wybrany do badań interakcji w układzie modelowym czystych wzorców jako dominujący związek fenolowy kawy (Durak i in. I; Durak i in. II; Durak i in. III). Analiza jakościowo-ilościowa związków bioaktywnych w przyprawach wniosła nową wiedzę w tym zakresie, zwłaszcza w kontekście metody analitycznej. Można więc było pod względem profilu polifenolowego uszeregować badany materiał jak następuje: chili (966 mg/g) > kawa (224,9 mg/g) > cynamon (64,7 mg/g) > imbir (5,4 mg/g) > kardamon (2.1 mg/g). Doktorantka w swojej pracy charakteryzuje układ trawienny *in vitro* jako wydajny system ekstrakcyjny. Do końca z tym stwierdzeniem nie mogę się zgodzić, albowiem po trawieniu *in vitro* naparu kawy sumaryczna zawartość związków fenolowych była ponad dwukrotnie niższa (Durak i in, I,II, III), w przypadku naparu z cynamonu, imbiru i kardamonu spadek wynosił odpowiednio 35% (Durak i in. I), 52% (Durak i in. II) i 16%

(Durak i in. III)). Z drugiej strony w naparze kardamonu po trawieniu *in vitro* Doktorantka stwierdziła prawie trzykrotny wzrost zawartości związków fenolowych ogółem natomiast w trawionym naparze kawy nieznaczny 11% spadek zawartości fenoli ogółem (Durak i in. III). Ponadto, choćby na podstawie zdolności trawionych naparów kawy i przypraw (z pominięciem chili) do wymiatania kationorodnika ABTS Doktorantka stwierdziła wyraźny wzrost aktywności, który był słabo skorelowany z sumaryczną zawartością związków fenolowych ( $r = -0,60$ ). Wskazywać to może na szerszą rolę zastosowanego symulowanego trawienia *in vitro*, bądź na obecność innych związków nie objętych analityką lub silne interakcje związków bioaktywnych obecnych w naparach kawy i przypraw po trawieniu. W tym kontekście poproszę Doktorantkę o komentarz.

Interesującym aspektem, oprócz oceny wielokierunkowej pojemności antyoksydacyjnej naparu kawy i przypraw, była analiza zdolności badanych naparów do hamowania aktywności enzymów prooksydacyjnych takich jak lipooksygenaza i oksydaza ksantynowa. Doktorantka wykazała zdolność ekstraktów kawy oraz cynamonu, imbiru i kardamonu do hamowania *in vitro* aktywności lipooksygenazy, przy czym co istotne, zdolność ta była istotnie wyższa po trawieniu *in vitro*. Ten sam trend zaobserwowała również dla naparu kawy i kardamonu w aspekcie badania aktywności oksydazy ksantynowej.

Badania te stanowiły podstawę do weryfikacji najważniejszej hipotezy badawczej pracy mówiącej, że interakcje bioaktywnych składników kawy oraz wybranych dodatków funkcjonalnych wykorzystanych do wzbogacania odgrywają istotną rolę w modyfikacji jej potencjału biologicznego.

W pierwszej pracy (Durak i in. I) dotyczącej kawy wzbogaconej cynamonem Doktorantka na podstawie badania pojemności przeciwutleniającej testem ABTS wykazała antagonistyczne działanie związków bioaktywnych obecnych w naparach. Ten typ interakcji został potwierdzony również w układzie modelowym zawierającym czyste chemicznie wzorce zidentyfikowane jako dominujące związki fenolowe tzn. kwas chlorogenowy i cynamonowy. Można zatem było założyć, że przy prawidłowo dobranym modelu wzorców obserwowany rodzaj interakcji będzie również obecny w badaniu innych parametrów wielokierunkowej aktywności antyoksydacyjnej mieszaniny naparów kawy i przypraw. I rzeczywiście zostało to potwierdzone poprzez synergistyczne działanie inhibitorów lipooksygenazy zawartych w naparze kawy i cynamonu oraz w naparze kawy i kardamonu (Durak i in. II), ale już nie w naparze kawy i imbiru (Durak i in. II). Jednakże po trawieniu *in vitro* obserwowany rodzaj interakcji był zbieżny w większości przypadków z tym uzyskanym w modelu substancji wzorcowych, w mniejszym zakresie jednak z typem interakcji

obserwowanym w naparach kawy z cynamonem, imbirem, kardamonem i chili. Z uwagi na zróżnicowany profil związków fenolowych w przyprawach wskazuje to jednoznacznie, że każdy rodzaj kawy wzbogaconej konkretną przyprawą należy rozpatrywać indywidualnie. Pracę doktorską kończy 5 wniosków, które stanowią weryfikację postawionych w celach pracy hipotez badawczych. Są one trafne, choć w mojej opinii zbyt uogólnione.

Podczas wnikliwej analizy pracy nasunęły mi się pytania i uwagi. W tym miejscu chciałbym jednak zapytać, co uzasadniało wybór kwasu cynamonowego w układzie modelowym w pracy Durak i in. I, skoro jego zawartość w naparze z cynamonu była najniższa. Ponadto, co uzasadniało wybór kwasu kawowego w układzie modelowym w pracy Durak i in. II, skoro nie został on zidentyfikowany w naparze z imbiru? Ponadto chciałbym zapytać Doktorantkę czy na podstawie analizy izoboli można z całą pewnością dokonać transformacji rodzaju interakcji pomiędzy naparem kawy i przypraw oraz pomiędzy dominującymi związkami fenolowymi kawy i przypraw w takim zakresie suplementacji, który byłby akceptowany przez panel sensoryczny? W przypadku kawy wzbogaconej kardamonem suplementacja na poziomie 0.5% okazała się być najbardziej celowa w ocenie panelu sensorycznego (Durak i in. III). Szkoda, że Doktorantka nie przeprowadziła oceny sensorycznej kawy wzbogaconej cynamonem, imbirem i chili.

## WNIOSEK KOŃCOWY

Rozprawę doktorską Pani mgr inż. Agaty Durak-Dados pt. „Interakcje bioaktywnych składników kawy i wybranych dodatków funkcjonalnych jako czynnik modyfikujący potencjalną aktywność biologiczną” oceniam pozytywnie. Z dużą satysfakcją mogę stwierdzić, że oceniana praca doktorska stanowi spójny tematycznie cykl prac i wnosi istotne nowe treści do chemii żywności i żywności funkcjonalnej. W tym miejscu chciałbym podkreślić, że wykonane badania były bardzo pracochłonne i wymagały od Doktorantki dużej wiedzy, umiejętności i skrupulatności analitycznej.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa nt. „Interakcje bioaktywnych składników kawy i wybranych dodatków funkcjonalnych jako czynnik modyfikujący potencjalną aktywność biologiczną” spełnia wymogi określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” (dz. U. Nr 65, poz. 65, z późniejszymi zmianami) i zwracam się do Rady Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii Uniwersytetu

Przyrodniczego w Lublinie, o przyjęcie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Agaty Durak-Dados i dopuszczenie pracy do publicznej obrony.

Wysoki poziom naukowy ocenianej pracy motywuje mnie do złożenia Wysokiej Radzie wniosku o wyróżnienie Doktorantki w sposób praktykowany na Wydziale Nauk o Żywności i Biotechnologii.

Henryk Weliński