

Prof dr hab. inż. Agnieszka Bartoszek
Politechnika Gdańska
Katedra Chemii, Technologii
i Biotechnologii Żywności

ul. Narutowicza 11/12
80-233 Gdańsk
tel: 58 347 17 23
fax: 58 347 22 48
e-mail: agnieszka.bartoszek@pg.edu.pl



Gdańsk, 15 luty 2022

Ocena rozprawy doktorskiej

mgr inż. Kai Katarzyny Karwowskiej

pt. "Innowacyjne metody określania jakości i badania autentyczności herbat Pu-erh"

Wzrost poziomu życia mieszkańców Polski, ale także innych dynamicznie rozwijających się rejonów świata, zapoczątkował zmiany w postrzeganiu żywności już nie tylko jako źródła substancji odżywczych, ale też jako sposobu na urozmaicenie codziennej rutyny czy wręcz poznawanie różnych kultur, także bardzo egzotycznych. Herbata jest dość typowym, tradycyjnym elementem polskiej diety, toteż w jej przypadku wspomniane urozmaicenie doznań wiąże się przede wszystkim z rosnącym zainteresowaniem konsumentów jej odmianami zapewniającymi nowe wrażenia sensoryczne. Stąd popularność sklepów oferujących szeroką gamę herbat i gotowość konsumentów do płacenia wysokich cen za herbatę wysokiej jakości. Ten trend niestety wiąże się także z rosnącą pokusą oszustw, a zafałszowania żywności to ogromny problem, z którym instytucje odpowiedzialne za kontrolę jakości żywności, już nie tylko jej bezpieczeństwo, muszą sobie poradzić. Stąd też poszukiwania nowych podejść metodycznych pozwalających wiarygodnie, szybko i możliwie małym kosztem ocenić jakość, rodzaj i autentyczność artykułów spożywczych. Temu celowi do oceny herbaty Pu-erh mają służyć badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej Pani mgr inż. Kaji Katarzyny Karwowskiej.

Praca doktorska została zrealizowana w Katedrze Zarządzania Jakością na Wydziale Zarządzania i Nauk o Jakości Uniwersytetu Morskiego w Gdyni pod opieką Prof. dr hab. Marii Śmiechowskiej jako promotora i Dr hab. inż. Przemysława Dmowskiego jako promotora pomocniczego. Promotor pracy, Prof. dr hab. Maria Śmiechowska, jest znaną specjalistką w dziedzinie nauk o żywności i żywieniu, a jej szczególnym naukowym polem

zainteresowań są jakością żywności, w tym zdrowotną, i towaroznawstwo artykułów żywnościowych. Żywnością o wysokiej jakości zdrowotnej, ale łatwo ulegającą zepsuciu, a przy tym często będącą przedmiotem zafałszowań są napoje zawierające bioaktywne związki polifenolowe i alkaloidy metyloksantynowe, takie jak kawa, kakao i herbata. W tym kontekście temat projektu doktorskiego dotyczący herbaty Pu-erh o szczególnych cechach sensorycznych i zdrowotnych oraz potwierdzenie jej autentyczności i pochodzenia staje się zrozumiałym mimo pewnej egzotyczności tego produktu. Ta unikalność jest zapewne przyczyną bardzo ograniczonego piśmiennictwa naukowego i brakiem standardowych metod oceny jakości, potwierdzenia rodzaju i autentyczności herbat Pu-erh. Zmiany tego stanu rzeczy podjęła się mgr Kaja Karwowska w ramach swojej pracy doktorskiej. Celem podjętych badań była próba znalezienia parametrów pozwalających na identyfikację rodzajów herbaty Pu-erh, a przez to jednocześnie potwierdzenie jej autentyczności. Ponieważ takim wyznacznikiem może być m.in. oznaczenie składu bioaktywnych wtórnych metabolitów, w tym przypadku przede wszystkim związków polifenolowych i metyloksantyn, to realizacja głównego celu pracy dostarcza też informacji o walorach prozdrowotnych danego rodzaju herbaty.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska zawiera 173 strony. Na dysertację składają się następujące rozdziały: Wstęp (4 bloki tematyczne), Cel, założenia i hipotezy badawcze, Materiały i metody badań, Wyniki badań i dyskusja, Podsumowanie i wnioski oraz Bibliografia obejmująca 191 publikacji naukowych oraz 36 innych źródeł informacji. Ponadto na końcu pracy umieszczono Streszczenia w języku polskim i angielskim, Spis rysunków, Spis tabel, Załączniki zawierające wyniki oznaczeń i płytę CD z wgraną wersją pdf rozprawy doktorskiej. Od strony technicznej, dysertacja przygotowana jest perfekcyjnie i mimo mojego dużego doświadczenia edytorskiego odnotowałam tylko kilka, zupełnie nieistotnych, błędów typu "literówek", o których nawet nie warto wspominać.

Wstęp teoretyczny rozprawy jest bardzo wyczerpującym przeglądem dostępnego piśmiennictwa dotyczącego herbaty Pu-erh. Zawiera on cztery wątki ściśle powiązane z tematyką pracy. Pierwszy to definicje i omówienie rodzajów herbaty ze szczególnym uwzględnieniem herbat Pu-erh i zaznaczeniem na jakie trudności napotykają próby ich identyfikacji i klasyfikacji. Przedmiotem drugiego jest charakterystyka towaroznawcza tej herbaty na tle pokrewnych produktów. Bardzo starannie Doktorantka omówiła w nim aspekty botaniczne oraz typy upraw krzewów i drzew herbacianych wykorzystywanych w produkcji herbat Pu-erh. Opisanie są także tradycyjne i współczesne technologie przetwarzania surowca i ich powiązanie z klasyfikacją tych herbat; dla laika bardzo cenne są także fotografie ilustrujące podane informacje. Trzeci wątek obejmuje przegląd literatury dotyczącej substancji bioaktywnych występujących w różnych rodzajach herbaty Pu-erh, a także wpływu procesów starzenia i fermentacji na kształtowanie się ich składu, a co za tym idzie działania biologicznego. Do tej chemicznej części mam dwie uwagi. W tabeli 3.1 porównującej skład wybranych związków w herbacie Raw i Ripe Pu-erh niektóre zawartości są podane w %. Ich

suma przekracza 100% w przypadku substancji nielotnych i jest mniejsza od 100% dla składników aromatu. Czego te procenty dotyczą? Doktorantka wspomina też o związkach z grupy teaflawin i tearubigin, ale nie poważyła się spolszczyć nazwy *theabrownin*; zachęcam do odwagi w tym względzie. Ktoś musi być pierwszy i przypisać polskojęzyczny odpowiednik tej grupie substancji. W tej części rozprawy omówione zostały także opisane w literaturze naukowej chemoprewencyjne właściwości naparów herbaty Pu-erh wskazując na ich użyteczność w profilaktyce chorób nowotworowych, osteoporozy, cukrzycy i innych chorób metabolicznych oraz w spowalnianiu procesów starzenia. Wspomniane są także aktywności przeciwdrobnoustrojowa i przeciwzapalna, a także wynikający z obecności polifenoli potencjał antyoksydacyjny. Wszystkie wspomniane tematy są omówione na poziomie rozszerzonym, wyczerpująco, często ze wskazaniem składnika odpowiedzialnego za efekt biologiczny, ale też wskazując na braki w obecnej wiedzy. Ostatni wątek poruszony we wstępie teoretycznym to aspekty wiążące się z postrzeganiem produktów żywnościowych przez konsumentów, a są nimi właściwości sensoryczne (na ogół przy wyborach przeważające nad zdrowotnymi) i wartość finansowa. Jak dowiedziałam się z bardzo interesującego opisu i przedstawionych danych rynkowych dla herbaty Pu-erh mogą niektóre jej rodzaje osiągać bardzo wysokie ceny, a to rodzi pokusę spekulacji i fałszerstw. Ma takim nadużyciom przeciwdziałać zastosowanie mniej lub bardziej zaawansowanych narzędzi analitycznych pozwalających na identyfikację rodzaju herbaty, ale te obecnie proponowane choć z naukowego punktu widzenia wydają się skuteczne, jak wskazuje Doktorantka, nie spotkały się z aprobatą producentów, sprzedawców czy mistrzów herbaty. W tym miejscu trochę mi zabrakło przykładowych ilustracji dokumentujących omawiane wyniki badań. Tym niemniej stanowi ten opis bardzo przekonujące uzasadnienie celowości podjęcia kolejnych wysiłków służących opracowaniu metod pozwalających na wiarygodną i zadowalającą osoby odpowiedzialne za produkcję i obrót handlowy ocenę jakości i rodzaju tego artykułu, choć jak wskazuje opracowanie sporządzone przez Doktorantkę, nawet definicja herbaty Pu-erh będąca podstawą do oceny jej autentyczności jest przedmiotem debaty.

Cel pracy został bardzo precyzyjnie przedstawiony, a wcześniejsze rozdziały, jak już wspomniałam, znakomicie go uzasadniały. Zamiarem Doktorantki było podjęcie próby opracowania zestawu metod analitycznych, które w sposób możliwie nieskomplikowany i szybki pozwoliłyby na identyfikację rodzajów herbaty Pu-erh, ale też być może ocenę jej jakości zdrowotnej. Do realizacji tego celu użyte zostały dobrze scharakteryzowane herbaty liściaste Pu-erh sprowadzone z Chin, które stanowiły materiał wzorcowy do określenia cech-wyróżników poszczególnych rodzajów herbaty Pu-erh (w uproszczeniu Raw i Ripe), a następnie Doktorantka wykorzystwała poczynione obserwacje do ustalenia rodzaju dostępnych handlowo na terenie Trójmiasta herbat deklarowanych przez sprzedawców jako Pu-erh.

Kolejny rozdział poświęcony jest omówieniu procedur eksperymentalnych, bardzo szczegółowo opisanych, z łatwością można by było powtórzyć przeprowadzone pomiary, wykorzystać opisy metod do analizy składu frakcji polifenoli oraz alkaloidów, a także oceny jakości mikrobiologicznej badanych herbat. Opisy metod zawierają wszystkie szczegóły ważne dla powtórzenia oznaczeń przez inną osobę. Ten rozdział także przy okazji pokazuje różnice w pieczołowitości opisu herbat Pu-erh przez sprzedawców chińskich i lokalnych; w pierwszym przypadku podany jest rodzaj herbaty, rocznik produkcji i pochodzenie materiału roślinnego, zarówno regionalne, jak i typ uprawy (choć zrozumielała po przejrzeniu tabeli 6.1 staje się intencja Doktorantki, to w pierwszym momencie podpis pod mapą na rys. 6.1 wprawia w pewne zakłopotanie). W przypadku herbat zakupionych w Trójmieście, kupujący dowiadyuje się właściwie tylko, że jest to herbata Pu-erh i ile kosztuje. Bardzo ten fragment był pouczający dla mnie jako konsumenta. Na bardzo wysoką ocenę zasługuje też zasygnalizowany w tym rozdziale zakres analiz statystycznych, który konsekwentnie był stosowany przy opracowaniu wyników, bardzo podnosząc wydźwięk merytoryczny używanych wyników doświadczalnych. Zakres podjętych badań i ich rozplanowanie uważam za właściwe. Zabrakło mi tylko do analizy porównawczej jakiejś grupy, choćby niewielkiej, prób herbaty innego typu, dzięki czemu można by zweryfikować wiarygodność zaproponowanych metod w potwierdzeniu nie tylko rodzaju, ale w ogóle autentyczności herbaty Pu-erh.

Rozdziały rozprawy poświęcone prezentacji i omówieniu wyników (Rozdział 7) są przygotowane niezwykle starannie. Wyniki zebrane w tabelach i zilustrowane na wykresach z łatwością można prześledzić, a dzięki analizie statystycznej także ocenić ich istotność. Staranność Doktorantki jest tu najwyższej próby. Wykorzystując próby herbat sprowadzonych z Chin, Doktorantka weryfikuje krok po kroku możliwość wykorzystania wybranych parametrów fizyko-chemicznych i chemicznych jako potencjalnych własności cechujących dany rodzaj herbaty Pu-erh. Pierwszym źródłem tych wyróżników była analiza parametrów barwy naparów. To najprostsze podejście nie okazało się jednak skuteczne w rozróżnieniu badanych produktów "wzorcowych", choć wskazało na pewne podobieństwo lokalnie zakupionych produktów do herbat Ripe. Kolejny wyróżnik - skład i zawartość związków fenolowych - dostarczył informacji nie tylko różnicujących poszczególne rodzaje herbaty Pu-erh, ale też pozwolił na wyciągnięcie wielu wniosków co do wpływu obróbki i przechowywania na profil tych ważnych dla zdrowotności herbaty antyoksydantów. Są to oczywiście wnioski wymagające potwierdzenia w szerszej zakrojonych badaniach, ale dające jednak pojęcie o zmienności tego materiału roślinnego. Uzupełnieniem chromatograficznych oznaczeń składu związków bioaktywnych było oznaczenie aktywności przeciwutleniającej i obserwacja, że próby bogatsze w związki polifenolowe wykazują wyższą zdolność neutralizacji rodnika DPPH nie jest zaskakująca. Nie jest zaskakujący także fakt, że dłuższe dojrzewanie herbaty zmniejsza jej potencjał przeciwutleniający, ponieważ staje się ona

bardziej utleniona. Zależności te nie są jednak liniowe, ponieważ utlenienie spolimeryzowanych polifenoli może prowadzić do uwolnienia cząsteczek fenoli o niższej masie cząsteczkowej, ale o wyższej aktywności przeciwutleniającej. Tego typu przemiany, omówione na stronach 92-93 dają szerokie pole do popisu mistrzom herbaty w sterowaniu jej składem w trakcie dojrzewania, szczególnie w przypadku sztucznego postarzenia, gdzie łatwo można manipulować warunkami prowadzenia procesu technologicznego oraz wpływać na jego przebieg przy użyciu określonych kultur drobnoustrojów. Warto przy tej okazji zaznaczyć mniej uświadomiony fakt, że zmiana składu stwarza możliwości odmiennych interakcji pomiędzy polifenolami, co ma kluczowe znaczenie dla aktywności przeciwutleniającej ich mieszanin, jak to wykazaliśmy w naszych badaniach (Baranowska i in., Sci. Rep., 2021, 11:12282). Niekoniecznie w związku z tym trzeba poszukiwać przeciwutleniaczy innego typu sugerując uzależnienie ich powstawania od lokalizacji uprawy, co sugeruje Doktorantka za chińskimi badaczami (Zeng i in., 2016, ale tego odnośnika nie znalazłam w Bibliografii) na str. 92, koniec pierwszego akapitu. Wydawałoby się, że przy takiej zmienności składu frakcji polifenolowej, trudno oczekiwać znalezienia cechy różnicującej rodzaje herbaty Pu-erh, a jednak Doktorantka znalazła dwa metabolity o wyraźnie odmiennych zawartości pomiędzy herbatami Raw i Ripe. Są to teogalina i kwas galusowy, którego zawartość rośnie w herbatach typu Ripe. Na podstawie tych wyników Doktorantka zaproponowała stosunek zawartości tych dwóch pokrewnych substancji jako cechę, na podstawie której można potwierdzić przynależność herbaty Pu-erh do rodzaju Raw bądź Ripe. W przypadku metyloksantyn taką zależność można było domniemywać dla teofiliny i kofeiny; w tę ostatnią wydają się być bogatsze starsze i postarzone herbaty. Stosunek zawartości tych alkaloidów jako wyróżnik rodzaju herbaty zdaniem Doktorantki nie przeszedł weryfikacji statystycznej, aczkolwiek ja bym ostrożniej odrzuciła jego przydatność. Być może w skojarzeniu ze stosunkiem teogalina/kwas galusowy poprawiłby on skuteczność rozróżnienia wspomnianych dwóch rodzajów herbaty Pu-erh, a nawet umożliwił bardziej szczegółowe określenie rodzaju herbaty niż tylko podział na Raw i Ripe Pu-erh. W związku z tym nie odrzucałabym tego parametru różnicującego, a przyjrzałabym się raczej stosując narzędzia statystyczne ocenie badanych herbat przy skojarzonym użyciu obu wspomnianych stosunków i stwierdziła czy łącznie wnoszą nową jakość. Jest to tym bardziej uzasadnione, że polifenole i metyloksantyny mogą być oznaczane w tej samej analizie HPLC, a zatem nie zwiększając kosztu takiej skojarzonej oceny. Na pewno nie sposób polemizować z końcowym wnioskiem Doktorantki odnośnie tej części badań, że ...”potrzebne są dalsze badania, w których wykorzystano by bardziej zróżnicowany materiał badawczy”...

Kolejnym wyróżnikiem, którego użyteczność Doktorantka postanowiła sprawdzić była zawartość kwasu szczawowego, a dokładniej jego rozpuszczalnych soli obecnych w naparach. W opisie wspomniane jest, że obróbka technologiczna i czas przechowywania materiału roślinnego ma wpływ na zawartość szczawianów, ale zabrakło choćby sugestii jakie

mechanizmy bio(chemiczne) mogą być tu odpowiedzialne. Przytoczone wyniki (str. 110-112) nie wskazują na żadną prawidłowość, zatem ten parametr jako pozwalający na rozróżnienie rodzajów herbat Pu-erh został odrzucony. Tym niemniej zawartość szczawianów wpływa na zdrowotność herbaty, stąd taka informacja dla konsumenta może być ważna.

Ostatnią z metod przetestowanych przez Doktorantkę pod względem skuteczności rozróżnienia rodzajów herbat Pu-erh była analiza fluorescencyjnych widm wzbudzenia-emsji. Nie mam doświadczenia w tej dziedzinie, więc trudno mi ocenić potencjał takiego podejścia, aczkolwiek prezentowane wyniki pokazują pewne prawidłowości w obrazie 2D tych widm, które można powiązać z rodzajem herbaty. Techniki fluorescencyjne są bardzo czułe i wybiórcze, co jest szeroko wykorzystywane w badaniach próbek naturalnych, ale trochę niepokoi tak zdecydowane uzależnienie wyniku od rozcieńczenia naparu. Dla mnie jako laika, budzi to obawę, że przy dużej różnorodności materiału roślinnego może to utrudnić standaryzację metody, a co za tym idzie poważać wiarygodność wyników.

Trochę na marginesie głównego zadania badawczego, Doktorantka przeprowadziła również ocenę jakości mikrobiologicznej badanych herbat, która decyduje o bezpieczeństwie żywności. Muszę przyznać, że było dla mnie zaskoczeniem, że herbaty sprowadzane z Chin były tak wysokiej jakości pod tym względem, a te dostępne na trójmiejskim rynku tak zanieczyszczone. W tym kontekście budzi zadowolenie jakość herbaty Pu-erh poznańskiej firmy Astra, która jakością mikrobiologiczną dorównywała herbatom z Chin mimo znacznie niższej ceny. Jej napar również cechował się najniższą zawartością szczawianów. Kilkanaście lat temu, firma Astra miała duże kłopoty po wykryciu toksycznych mikotoksyn w produkowanych przez nią kawach, które musiały być zanieczyszczone produkującymi te związki grzybami. Widać, że lekcja została odrobiona i ich produkty stały się godne zaufania. Jako częstego konsumenta wyrobów firmy Astra taka informacja bardzo mnie ucieszyła.

Podsumowując, recenzowana praca zarówno pod względem koncepcji, wykorzystanego warsztatu badawczego i uzyskanych wyników dostarcza nowych narzędzi pozwalających na rozróżnienie rodzajów herbat Pu-erh oraz cennych informacji co do ich jakości zdrowotnej, w tym mikrobiologicznej. Przeprowadzone badania wskazują, że są wszelkie dane by sądzić, że rozszerzenie zakresu badań może doprowadzić do opracowania prostych, ale skutecznych podejść pozwalających na dostarczenie handlowcom i w konsekwencji konsumentom wiarygodnych informacji co do jakości, bezpieczeństwa oraz rodzaju herbaty Pu-erh, której zakup planują. Cel podjętych badań został więc z sukcesem zrealizowany, a wszystkie hipotezy badawcze zweryfikowane pozytywnie bądź negatywnie na podstawie właściwie przeprowadzonych badań. Trudno mi się oprzeć sugestii zweryfikowania przydatności do w/w celów jeszcze jednej nietrudnej a skutecznej metody analizy złożonych próbek roślinnych, a mianowicie sporządzenia profili substancji bioaktywnych metodą wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej HPTLC. Nasz zespół dysponuje odpowiednim sprzętem i niewielkim nakładem kosztów i pracy mogłaby

Doktorantka przeprowadzić taką analizę swoich próbek korzystając z doświadczenia naszego zespołu.

Uważam, że przedstawiona do recenzji rozprawa pt. “Innowacyjne metody określania jakości i badania autentyczności herbat Pu-erh” spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim w dziedzinie nauk społecznych, w dyscyplinie nauki o zarządzaniu i jakości, przez Ustawę o Stopniach i Tytule Naukowym oraz Stopniach i Tytule Naukowym w Zakresie Sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz.U. nr 65, poz 595) z późniejszymi zmianami (Dz. U./z 2017 r., poz 1789) i przedstawiam Radzie Naukowej Wydziału Zarządzania i Nauk o Jakości Uniwersytetu Morskiego w Gdyni wniosek o dopuszczenie Pani mgr inż. Kaji Katarzyny Karwowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, doceniając zakres i nowatorstwo podjętych badań, a także możliwość ich wykorzystania praktycznego na potrzeby określenia tak ważnych cech rynkowych jak zidentyfikowanie rodzaju, jakość zdrowotna oraz potwierdzenie autentyczności herbaty Pu-erh wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Kaji Katarzyny Karwowskiej.

Gdańsk, 15.02.2022

A. Baranek