UNIWERSYTET ROLNICZY W KRAKOWIE

Kraków, 16.06.2023 r.

Prof. dr hab. inż. Paweł Satora

Katedra Technologii Fermentacji i Mikrobiologii

Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Xi He pt. „Chromatografia gazowa i techniki łączone w ocenie autentyczności i jakości alkoholi Baijiu", wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Henryka H. Jelenia w Pracowni Badania Związków Lotnych i Aktywnych Sensorycznie, Katedry Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego, Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

Rynek napojów spirytusowych osiągnął w roku 2023, globalnie wartość 525,31 mld USD i jak się prognozuje będzie rozwijał się w kolejnych latach (2023-2027) w tempie 4,56% rocznie. W zestawieniu globalnym większość przychodów jest generowana w Chinach (165,90 mld USD w 2023 r.). Na krajowym rynku wyrobów spirytusowych w Chinach, dominuje Baijiu stanowiąc 94 procent całkowitej wartości sprzedaży. Większość chińskiej produkcji tego trunku jest konsumowana na rynku krajowym, podczas gdy tylko około dwóch procent chińskiej produkcji tego napoju było eksportowane. Baijiu dosłownie oznacza „biały likier" w języku mandaryńskim. Jest to tradycyjny destylowany napój alkoholowy, który zazwyczaj zawiera od 35 do 60 procent alkoholu. Najczęstszym składnikiem do produkcji Baijiu jest sfermentowane sorgo. Jednak inne ziarna, takie jak ryż i pszenica, również mogą być używane. W oparciu o charakterystykę aromatu, można wyróżnić 12 rodzajów Baijiu, przy czym cztery z nich, tj. Strong, Sauce, Light i Rise to najbardziej podstawowe, a wszystkie pozostałe pochodzą od z wyżej wymienionej czwórki. Baijiu jest często uważany za narodowy napój Chin, którym delektuje się przy różnych okazjach, od spotkań rodzinnych po bankiety biznesowe (prognozowana konsumpcja tego trunku w 2025 roku ma wynieść 5,1 mld litrów).

Tak duży rynek stwarza możliwość pojawienia się zafałszowań, które mogą być związane, m.in. z wykorzystaniem tańszych surowców, zastosowania niewłaściwej (mniej kosztochłonnej) technologii wytwarzania, skrócenia okresu dojrzewania, czy też niewłaściwego miejsca geograficznego pochodzenia. Obecnie rozróżnianie typów Baijiu na

podstawie ich aromatów, odbywa się głównie przy wykorzystaniu oceny sensorycznej, badania składników użytych do warzenia oraz analizy procesu produkcji. Szkolenia eksperckie generują zwykle bardzo wysokie koszty dla przedsiębiorstw i są trudne do wdrożenia w warunkach kontroli rynku na dużą skalę, istotne wydaje się w związku z powyższym zaprojektowanie metody analitycznej, która umożliwiła by ocenę autentyczności wyrobu, a pozbawiona byłaby ww. wad.

Obecnie do określania autentyczności napojów alkoholowych wykorzystywane są różne metody oparte na rozdziale chromatograficznym, spektrometrii mas, spektroskopii oraz zastosowaniu różnych sensorów. W przypadku napojów fermentowanych, w tym spirytusów najczęściej do tego celu używa się metod chromatografii gazowej, ze względu na obecność w produktach dużej ilości komponentów lotnych, których udział jakościowy i ilościowy, może być swoistym „odciskiem palca" analizowanego wyrobu.

Tematyka związana z badaniem różnych aspektów produkcji Baijiu cieszy się w ostatnich latach bardzo dużym zainteresowaniem. W bazie Web of Science Core Collection znajduje się obecnie 713 artykułów naukowych w tym temacie, przy czym 644 pochodzą z ostatnich 5 lat, a 642 to oryginalne artykuły badawcze. Analizowane są aspekty mikrobiologiczne dotyczące rozwoju różnych mikroorganizmów w trakcie procesu fermentacji spontanicznej Baijiu i ich wpływu na produkt (178), badania składu chemicznego (213), aspekty związane z wartością odżywczą (75), czy też wpływem technologii na jakość (413). 185 artykułów dotyczy wykorzystania chromatografii gazowej, natomiast tylko 7 związanych jest z wykrywaniem zafałszowań omawianego napoju fermentowanego.

Prace opublikowane przez Panią mgr inż. Xi He, wpisują się w ww. opisany trend i wprowadzają nowe informacje metodologiczne i analityczne, dotyczące powiązania składu chemicznego Baijiu, z ich pochodzeniem geograficznym, typem (związanym z technologią produkcji), a także surowcami wykorzystanymi do otrzymywania napojów. Przedstawione wyniki badań mają duże znaczenie aplikacyjne, ze względu na możliwość ich wykorzystania przez producentów, dystrybutorów, a także jednostki kontrolne do badania autentyczności różnych partii napojów spirytusowych typu Baijiu.

Jako swoje osiągnięcie naukowe do postępowania doktorskiego mgr inż. Xi He, przedstawiła cykl składający się z 4 prac opublikowanych w latach 2020-2023 w czasopismach, znajdujących się w bazie JCR tj. wydawanym przez John Wiley & Sons, Inc. - czasopiśmie Journal of the Institute of Brewing (1 praca), wydawnictwa Elsevier (2 prace) - Food Chemistry oraz Journal of Chromatography A oraz ACS publications – Journal of Agricultural and Food Chemistry. Sumaryczny Impact Factor prac stanowiących podstawę ubiegania się o stopień doktora wynosi 21,512, a suma punktów według punktacji MNiSW, obliczonej według roku publikacji, wynosi 480, wg Web of Science liczba cytowań tych prac na dzień 16 czerwca 2023 roku wynosi 52. Są to prace zespołowe, wykonane we współpracy z innymi pracownikami Katedry Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego, Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytetu Przyrodniczego we Poznaniu, w których doktorantka figuruje jako pierwszy z Autorów. W dokumentacji znajdują się oświadczenia współautorów potwierdzające udział w tworzeniu tych publikacji, brak jednakże procentowego udziału mgr inż. Xi He, w ich powstawaniu. Zgodnie z informacjami

zawartymi w oświadczeniach, rola Doktorantki w przygotowaniu artykułów polegała na współtworzeniu koncepcji badań, pozyskaniu materiału do badań, współopracowaniu chromatograficznej metody analitycznej wraz z jej zweryfikowaniem i walidacją, wykonaniu wszystkich analiz GC, interpretacji wyników i zastosowaniem odpowiednich metod statystycznych oraz przygotowaniu publikacji do druku, a także korespondencji z recenzentami, w odpowiedzi na ich uwagi.

Przedstawiona do oceny praca obejmuje 41 stron maszynopisu, Następnie załączone zostały publikacje będące przedmiotem rozprawy doktorskiej oraz oświadczenia współautorów tych publikacji. Spis literatury zawiera 71 pozycji, w przeważającej większości oryginalne i anglojęzyczne, z których znacząca część to prace opublikowane w czasopismach międzynarodowych z tzw. listy filadelfijskiej. Większość pozycji bibliograficznych pochodzi z ostatnich 10 lat – 51 pozycji, 72%.

Praca została podzielona na 5 zasadniczych rozdziałów, obejmuje także streszczenia w języku polskim i angielskim. Forma pracy jest przejrzysta, a umieszczony na początku opracowania spis treści ułatwia czytelnikowi orientację i szybkie dotarcie do zagadnień zawartych w poszczególnych rozdziałach. Proporcje poszczególnych rozdziałów są racjonalne.

Rozdział Wprowadzenie (zajmuje 15 stron) pełni rolę przeglądu aktualnej literatury na temat przedmiotu badań, uzasadnia również zasadność podjętych badań oraz dobór metod analitycznych. Autorka sformułowała 4 cele badawcze, odpowiadające każdej z załączonych publikacji. Brakuje trochę hipotez badawczych, które Doktorantka chciała udowodnić lub odrzucić w toku swoich badań. Wyniki uzyskane w trakcie badań omówione zostały oraz krótko przedyskutowane na 9 stronach. W tekście zamieszczono wybrane chromatogramy, które miały ułatwić zobrazowanie wyników, a które nie znalazły się w opublikowanych artykułach. Główną część Pracy kończą 4 ogólne wnioski zestawiające najważniejsze osiągnięcia uzyskane w cyklu doświadczeń, a także krótkie podsumowanie.

Rozprawa jest zredagowana starannie, napisana poprawnym językiem, wskazuje na dobrą orientację Doktorantki w obszarze poruszanych zagadnień.

Praca rozpoczyna się Wprowadzeniem przybliżającym wątki będące przedmiotem dysertacji. Obejmuje ono przegląd aktualnego stanu wiedzy na temat zagadnień opisanych w pracy, m.in. dotyczące rodzajów Baijiu, technologii wytwarzania głównych jego typów (Sauce Baijiu, Strong Baijiu, Light Baijiu), mikroorganizmów zaangażowanych w ich produkcję, metod wykorzystywanych do określania autentyczności różnych napojów spirytusowych (w tym Baijiu), a także metod analitycznych i statystycznych, które wykorzystane zostały podczas doświadczeń.

Do tego rozdziału odnosi się tylko jedna moja uwaga dotycząca wymienianych przez Autorkę rodzajów zafałszowań napojów alkoholowych (strona 11). W punkcie 1, Doktorantka podaje że jednym z możliwych zafałszowań jest „Dodatek wody lub innych tańszych składników bez deklaracji, np. dodanie do produktu spirytusu denaturowanego lub metanolu o przeznaczeniu przemysłowym.”. O ile rzeczywiście rozcieńczanie napojów lub używanie tańszego spirytusu nie przeznaczonego do spożycia ma miejsce, to jednak dodatek metanolu, który odznacza się silną toksycznością już w niskich dawkach, zdarza się niezwykle rzadko, a ewentualna

obecność metanolu w napoju alkoholowym, nie jest zamierzona, a raczej jest skutkiem użycia spirytusu niskiej jakości, albo zastosowaniem specyficznej obróbki enzymatycznej w trakcie jego otrzymywania.

Celem pracy było uzyskanie metod chromatograficznych i/lub technik łączonych umożliwiających ocenę autentyczności i jakości napojów alkoholowych Baijiu.
Do eksperymentów, sformułowano również 4 cele szczegółowe:

- Zidentyfikowanie i określenie ilościowe bardziej lotne związki, a także powiązanie składu chemicznego z pochodzeniem geograficznym i typem Baijiu. Zbadano prostą metodę wykorzystującą bezpośrednie nastrzykiwanie na dwie kolumny o różnej polaryzacji jednocześnie w systemie GC-FID.
- Wykorzystanie różnych kombinacji kolumn w systemie GC × GC-TOFMS do określania typów aromatów Baijiu i ich pochodzenia regionalnego. Przeprowadzono analizę profilu lotności z tego samego zestawu próbek Baijiu przy różnych konfiguracjach kolumn.
- Porównanie dwóch szybkich metod, HS-SPME-MS z nosem elektronicznym opartym na chromatografii gazowej (GC-E-Nose), jako narzędzi do oceny autentyczności typów aromatu Baijiu i pochodzenia regionalnego na podstawie lotnego odcisku palca.
- Zbadanie możliwości wykorzystania lotnego odcisku palca uzyskanego metodą HS-SPME-MS, do śledzenia botanicznego pochodzenia surowych alkoholi, HS-SPME-MS zestawiono z IR-MS, analizując ten sam zestaw Baijiu i surowych alkoholi.

Rozdział „Opis badań" zawiera skrócony opis przeprowadzonych doświadczeń i wykorzystanych metod analitycznych, a także omówienie najważniejszych uzyskanych w trakcie analiz wyników. Opisy metod analitycznych zamieszczone w Pracy, a także publikacjach na nią się składających są przejrzyste i świadczą o znakomitym przygotowaniu analitycznym Doktorantki do prowadzenia tego typu badań. Do realizacji doświadczeń Doktorantka wykorzystała szeroki wachlarz metod analitycznych i statystycznych. Do badań użyto chromatografię gazową z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (GC-FID), mikroekstrakcję do fazy stałej związków z fazy nadpowierzchniowej połączoną z kompletną dwuwymiarową chromatografią gazową z spektrometrią mas czasu przelotu (HS-SPME-GC×GC-TOFMS), spektrometrię mas bez rozdziału chromatograficznego (HS-SPME-MS), elektroniczny nos oparty na ultraszybkiej chromatografii gazowej (GC-E-Nose) oraz spektrometrię mas stabilnych izotopów (IRMS). Ponadto do wizualizacji, interpretacji i analizy uzyskanych wyników zastosowano, m.in. takie metody analizy statystycznej, jak ortogonalna metoda cząstkowych najmniejszych kwadratów, połączona z analizą dyskryminacyjną (OPLS-DA), multiblokowa analiza ortogonalna komponentów (MOCA), analiza głównych składowych (PCA), czy sztuczne sieci neutronowe (ANN).

Rozdział 5 prezentuje wszystkie cztery publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej. W pierwszej z nich – „Determination of volatile compounds in Baijiu using simultaneous chromatographic analysis on two columns" opublikowanej w *Journal of the Institute of Brewing*, 126(2), 206-212, opracowano metodę oznaczania ilościowego 62 związków w spirytusie Baijiu podczas jednoczesnego bezpośredniego nastrzyku na dwie kolumny o różnej

polarności (CPWax-57CB i DB-624). Metoda charakteryzowała się wysoką liniowością ($R^2 \geq$ 0,999) oraz powtarzalnością. Granica wykrywalności wynosiła <1 mg/l dla wszystkich związków. W oparciu o ortogonalną analizę dyskryminacyjną cząstkowych najmniejszych kwadratów nie było możliwe rozróżnienie próbek pod względem regionu pochodzenia, natomiast możliwe było odróżnienie Baijiu typu Strong i typu Soy sauce od innych próbek. Do publikacji mam tylko jedną uwagę. Nie jasne jest skąd pochodzi stwierdzenie Autorów, że Baijiu jest bogatsze w związki aromatu, niż whisky i brandy, zawierając około 60 kluczowych związków aromatu, względem odpowiednio 20 i 30 w pozostałych dwóch trunkach. Cytowany jest tutaj artykuł „Mystery behind Chinese liquor fermentation" Guangyuan Jin, Yang Zhu, Yan Xu z Trends in Food Science & Technology, w którym tego rodzaju informacji nie ma.

W kolejnej publikacji „Comprehensive two-dimensional gas chromatography–time of flight mass spectrometry (GC× GC-TOFMS) in conventional and reversed column configuration for the investigation of Baijiu aroma types and regional origin" w Journal of Chromatography A, 1636, 461774, wykorzystano kompleksową dwuwymiarową chromatografię gazową w układzie kolumn konwencjonalnych i odwróconych (kolumny niepolarne – polarne i polarne – niepolarne) do różnicowania użytego we wcześniejszych badaniach zestawu 65 próbek Baijiu pod względem ich typu i pochodzenia geograficznego (regionu). Obie konfiguracje kolumn zapewniły doskonałą dyskryminację Baijiu typu Light, Soy sauce, Feng i Herbal. Lepszy wynik klasyfikacji dla Baijiu typu Strong i Jian odnotowano dla konwencjonalnego ustawienia kolumny. Przy użyciu OPLS-DA obie konfiguracje kolumn umożliwiały bardzo dobre rozróżnienie Baijiu typu Strong w zależności od regionu pochodzenia - Sichuan, Heilongjiang i Jiangsu. Odnośnie publikacji nasunęło się mi jedno pytanie. W podrozdziale 2.4 Autorzy podają, że „Komponenty, które były obecne w mniej niż 50% próbek, zostały wyeliminowane…", a czy to właśnie unikatowe dla danych próbek związki nie umożliwiłyby większe zróżnicowanie pomiędzy próbkami w analizach OPLS-DA.

W trzeciej publikacji „Rapid analysis of Baijiu volatile compounds fingerprint for their aroma and regional origin authenticity assessment.", Food Chemistry, 337, pp.128002 porównano przydatność mikroekstrakcji do fazy stałej – spektrometrię mas (SPME-MS) oraz elektroniczny nos oparty na szybkiej chromatografii gazowej (GC-E-Nose), do rozróżniania Baijiu różnego typu i pochodzenia geograficznego. Zbadano łącznie 65 próbek Baijiu reprezentujących 6 aromatów oraz 3 regiony (Strong aroma type). Dane zostały wstępnie przetworzone dla modeli wieloklasyfikacji (OPLS-DA), jak również dla modeli klasyfikacji binarnej (PLS-DA). Klasyfikacja przeprowadzona przy użyciu metody OPLS-DA wykazała, że zastosowanie SPME-MS do rozróżniania prób, okazało się bardziej przydatne i odznaczało się większą zdolnością przewidywania w porównaniu z GC-E-Nose. Łączny wskaźnik prawidłowej klasyfikacji dla SPME-MS wyniósł 94,44% dla odpowiedniego aromatu i 100% dla regionu pochodzenia, natomiast w przypadku nosa GC-E odpowiednio 91,53% i 93,94%.

Ostatnią publikacją z jednotematycznego cyklu publikacji jest „Can volatiles fingerprints be an alternative to isotope ratio mass spectrometry in the botanical origin determination of spirits?" Journal of Agricultural and Food Chemistry, 71(5), pp.2637-2643. Quasi-

elektroniczny nos oparty na spektrometrii mas wykorzystujący mikroekstrakcję do fazy stałej do wprowadzania substancji lotnych bezpośrednio do spektrometru mas bez rozdzielania chromatograficznego (HS-SPME-MS) został użyty do rozróżnienia 45 surowych spirytusów wyprodukowanych z roślin C3 (ziemniak, żyto, pszenica) i C4 (kukurydza, sorgo). Próbki poddano również spektrometrii masowej stosunku izotopów (IRMS), która jednoznacznie odróżniła próbki C3 od C4; jednakże nie zaobserwowano wyraźnego zróżnicowania wśród próbek C3. Natomiast metoda HS-SPME-MS, wykorzystująca „odciski palców" niezidentyfikowanych związków lotnych, w postaci jonów, o zadanym zakresie m/z i różnych intensywnościach, zapewniła doskonałą klasyfikację próbek po przetworzeniu danych metodą OPLS-DA, zweryfikowaną również przez sztuczną sieć neuronową (SSN).

Na podstawie wyników zaprezentowanych we wszystkich 4 publikacjach wysnuto 4 wnioski zaprezentowane w rozdziale Wnioski, wraz z krótkim podsumowaniem dotyczącym możliwości wykorzystania użytych metod analitycznych do rozróżniania próbek Baijiu w zależności od ich miejsca pochodzenia, typu aromatu oraz surowca roślinnego wykorzystanego do fermentacji.

Po zapoznaniu się ze złożonymi przez Doktorantkę pracami, nasunęły mi się następujące pytania na które prosiłbym o odpowiedź:

- w przedstawionych badaniach analizowano możliwość klasyfikowania prób Baijiu w zależności od typu aromatu, miejsca wytworzenia, rodzaju surowca użytego do produkcji, natomiast czynników, które mogą wpływać na skład chemiczny Baijiu może być więcej. Jak studentka mogłaby usystematyzować te czynniki od najbardziej do najmniej znaczących? Proszę o uzasadnienie odpowiedzi.

- w trakcie analiz wykryto kilkadziesiąt komponentów lotnych, czy mgr inz. Xi He mogłaby je pogrupować w zależności od pochodzenia i mechanizmu powstawania, tym samym prezentując jak tworzone są główne komponenty aromatu Baijiu?

Reasumując, Pracę przeczytałem z przyjemnością, ze względu na wieloletnie zainteresowanie zawodowe napojami fermentowanymi (w tym spirytusami), a także metodami chromatograficznymi wykorzystywanymi do ich analizy. Doceniam staranność pracy, walory estetyczne, nowatorstwo zastosowanych metod oraz opublikowanie wyników badań w czasopismach z „najwyższej półki". Na podstawie dysertacji wyrażam pogląd, że Doktorantka jest osobą przygotowaną do prowadzenia badań, dysponuje wieloaspektową wiedzą w obszarze przedstawionego zagadnienia oraz umie w jasny sposób prezentować wyniki swoich obserwacji i formułować wnioski. Ponadto Autorka wykazała się umiejętnością analitycznego podejścia w odniesieniu do prac innych autorów.

Podsumowując swoją ocenę stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Xi He pt. „Chromatografia gazowa i techniki łączone w ocenie autentyczności i jakości alkoholi Baijiu", łączy aspekty naukowe z praktycznymi stanowiąc istotny wkład w dziedzinę nauk o żywności i żywieniu. Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wymogi zawarte w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz w przepisach zmieniających ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 3 lipca

2018 roku (Dz.U. z 2018 pozycja 1669), stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień doktora.

Z powyższych powodów zwracam się do Dziekana oraz członków Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia, Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu <u>o dopuszczenie pani mgr inż. Xi He do dalszych etapów przewodu doktorskiego.</u>

<u>WYRÓŻNIENIE</u>

Jednocześnie po zapoznaniu się z pracą doktorską Pani mgr inż. Xi He, pt. „Chromatografia gazowa i techniki łączone w ocenie autentyczności i jakości alkoholi Baijiu", chciałbym zaproponować Szanownej Radzie Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu wyróżnienie pracy. Swoją propozycję uzasadniam ogromem pracy, którą Doktorantka musiała włożyć w tak kompleksową analizę zagadnienia, nowatorskim podejściem do analizy zafałszowań napojów spirytusowych, a także dużą rzetelnością w prezentacji wyników. Na podkreślenie zasługuje również wykorzystanie bardzo zaawansowanych technik analitycznych opartych na chromatografii i/lub spektrometrii, m.in. takich jak HS-SPME-GC×GC-TOFMS, HS-SPME-MS, GC-E-Nose oraz IRMS oraz statystycznych, takich jak OPLS-DA, MOCA, czy ANN, a także opublikowanie wyników badań w czasopismach z „najwyższej półki".

Prof. dr hab. inż. Paweł Satora