RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Xi He
pt: *Chromatografia gazowa i techniki łączone w ocenie autentyczności i jakości alkoholi Baijiu*
wykonanej w Pracowni Badania Związków Lotnych i Aktywnych Sensorycznie
Katedry Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego
Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu
promotor: prof. dr hab. inż. Henryk H. Jeleń

Szeroko pojęta kontrola jakości produktów przeznaczonych do spożycia obejmuje różne metody analityczne, pozwalające określić skład i oznaczyć zawartość głównych składników, składników objętych deklaracjami producentów, a także dopuszczalne i niedopuszczalne zanieczyszczenia produktu. W analityce procesowej, a także w kontroli produktu końcowego, rosnącą rolę pełnią rozmaite metody jakościowe. Można dostrzec w nich ukierunkowanie na postępującą automatyzację, konkurencję rynkowych producentów żywności, wydajne metody klasyfikowania jakości produktów spożywczych oraz obniżanie kosztów. Mniej lub bardziej zaawansowane metody analizy instrumentalnej w połączeniu z metodami analizy ilościowej, umożliwiają precyzyjne określenie zawartości składników produktów spożywczych. Z kolei, metody analizy jakościowej wraz z procedurami klasyfikacyjnymi, wykorzystującymi chemometryczną obróbkę danych, pozwalają na ocenę składu produktu.

Obecnie wśród najczęściej stosowanych technik izolacji związków lotnych z próbek żywności, wyróżnia się techniki oparte na badaniu fazy nadpowierzchniowej (ang. *headspace analysis*), w których bezpośrednio analizowane są związki uwolnione z próbki i znajdujące się w fazie gazowej nad badanym produktem. Ze względu na prostotę i małą, lub żadną ingerencję w skład chemiczny badanego produktu, metody te są szczególnie cenione w analizie związków zapachowych. Wśród tego typu technik najczęściej wykorzystywaną, ze względu na wszechstronność i uniwersalność, jest technika mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej (SPME), w której związki lotne ulegają sorpcji na włóknie pokrytym fazą ad/absorpcyjną, gdzie następuje ich adsorpcja. Włókno takie może być bezpośrednio wprowadzone do dozownika chromatografu gazowego, gdzie następuje desorpcja analitów. Jednocześnie nadal poszukuje się nowych technik, upraszczających i skracających czas analizy. Techniki te umożliwiają jednocześnie otrzymywanie niskich granic oznaczalności, a także jak najwyższą selektywność i rozdzielczość (zgodnie z koncepcją Purnella). Wraz z rozwojem kompletnej dwuwymiarowej chromatografii gazowej (GCxGC) notuje się coraz więcej aplikacji poświęconych profilowaniu związków lotnych tą techniką do identyfikacji pochodzenia geograficznego lub botanicznego. Pozwala to też na różnicowanie produktów spożywczych pod kątem specyficznego aromatu – ważnego z punktu widzenia preferencji konsumenta.

Wszystkie wyżej wspominane zagadnienia są podwaliną do powstania recenzowanej rozprawy. Doktorantka postanowiła opracować nowe metody analityczne do oceny autentyczności i jakości Baijiu – tradycyjnego chińskiego napoju spirytusowego. Unikalny sposób pozyskiwania tego trunku skutkuje tym, że charakteryzuje go bogactwo związków lotnych.

Istniejące tradycyjne warianty przeprowadzania procesu fermentacji powodują zróżnicowanie ze względu na główny aromat. Złożoność składu produktu wymaga zaawansowanych narzędzi analitycznych i chemometrycznych w celu zidentyfikowania jak największej ilości lotnych związków, charakteryzujących produkt pod kątem aromatu, pochodzenia geograficznego i botanicznego. Tak jak wiele produktów alkoholowych, Baijiu jest podrabiany m.in. poprzez dodatek wody albo innego, tańszego produktu. Fałszerstwom podlega też autentyczność botaniczna i geograficzna, mimo certyfikacji produktu jako żywność regionalna o chronionej nazwie pochodzenia. Z tego względu uważam, że zadanie, które postawiła przed sobą Doktorantka oraz Jej Promotor jest w pełni uzasadnione zarówno ze względów poznawczych, jak i aplikacyjnych. Tematyka ta z całą pewnością znajduje się w nurcie oryginalnych i aktualnych zagadnień badawczych.

Przedłożoną do oceny dysertację stanowią 4 prace naukowo-badawcze opublikowane w specjalistycznych czasopismach z tzw. *„listy JCR*", których współczynnik oddziaływania tzw. *impact factor* (IF) mieści się w przedziale od 2.216 do 9.231. Całość została poprzedzona streszczeniem w języku polskim oraz angielskim, a także przygotowanym w języku angielskim wprowadzeniem. Wprowadzenie to stanowi opis wytyczonych celów pracy wraz ze zwięzłym komentarzem wyników osiągniętych w wyniku realizacji dysertacji wraz z bibliografią (razem 41 str.). Pracę wieńczą oświadczenia współautorów o wkładzie wniesionym w powstanie każdej z publikacji. Analizując zamieszczone kopie publikacji stwierdzam, że jedna z nich jest dwuautorska (Doktorantka i p. Promotor), dwie z nich mają przypisanych trzech autorów, zaś jedna z nich jest pięcioautorska. Doktorantka jest pierwszym autorem we wszystkich przedstawionych pracach. Jednoznacznie wskazuje to na Jej dominujący udział w przygotowaniu niniejszego opracowania oraz w realizacji objętych harmonogramem badań. Publikacja wieloautorska świadczy z kolei o umiejętności pracy zespołowej, a także czerpania i adaptowania do swoich celów badawczych doświadczenia specjalistów. Szkoda, że Doktorantka nie przedstawiła zestawienia całego swojego dorobku: publikacji, rozdziałów, komunikatów posterowych, wystąpień ustnych oraz ewentualnych danych o przyznanych stypendiach, odbytych stażach czy pozyskanych środkach na prowadzenie projektów badawczych. Trudno mi ocenić aktywność naukową Doktorantki bez tych informacji. Ponadto, zasadne byłoby podanie, w oświadczeniach autorów, obok opisowego przedstawienia zaangażowania w powstanie publikacji, bardziej szczegółowego udziału poszczególnych członków zespołu realizującego wytyczone zadania. Pochwalić należy Doktorantkę za użyteczny, ze względów nomenklaturowych, wykaz skrótów i akronimów na początku autoreferatu.

Część teoretyczną, czyli opis piśmiennictwa światowego, stanowi syntetyczną treść, wprowadzającą czytelnika w problematykę związaną z tematem rozprawy. Doktorantka scharakteryzowała materiał swoich badań, przedstawiając technologie otrzymywania, podając nazewnictwo oraz charakterystyczne cechy produktu Baijiu w zależności od typu surowca i warunków przeprowadzonej fermentacji. Dużo uwagi poświęciła metodom analitycznym stosowanym w identyfikacji jakościowej i ilościowej składników, stanowiących kompozycje tego napoju. Niezwykle cenne i interesujące dane można znaleźć w Tabeli 2, zestawiającej przegląd sposobów postępowania w celu oceny autentyczności alkoholi destylowanych wraz z mierzonymi parametrami. W dalszej części Doktorantka przedstawia dane literaturowe na temat technik analitycznych zastosowanych w analizie Baijiu – wśród nich GC-FID, GCxGC-TOF/MS, *e*-nos (bazujący na odpowiednich czujnikach lub SPME/MS) czy IR/MS, wymieniając ich zalety oraz wady. Mogę jedynie stwierdzić, że tekst ten stanowi interesującą lekturę, dobrze nawiązującą do pozostałych części dysertacji i wprowadzającą w sposób bardzo zrozumiały i kompetentny czytelnika do dalszych zagadnień.

Zapoznanie się z tak przygotowanym wstępem teoretycznym uzasadnia w pełni stwierdzenie, że Doktorantka doskonale poznała stosowane techniki badawcze, śledzi na bieżąco literaturę przedmiotu, a dzięki temu koncepcja realizowanych w ramach rozprawy doktorskiej badań odpowiada najnowszym trendom literaturowym oraz oczekiwaniom metodycznym w obszarze oceny autentyczności alkoholi Baijiu. W tym miejscu chciałbym nadmienić, iż po przeczytaniu tej części dysertacji znacząco wzrosła moja wiedza na temat produkcji tradycyjnego chińskiego napoju Baijiu. Szkoda, że nie była możliwa jego degustacja.

Bez wątpienia uważam, że wytyczony przez Promotora i Doktorantkę **cel badań**, jakim było określenie autentyczności i jakości alkoholi Baijiu z wykorzystaniem wybranych narzędzi i metodyk analitycznych oraz chemometrycznych **został osiągnięty**. Dodatkowo, Doktorantce udało się wyciągnąć wiele interesujących wniosków na podstawie porównania wyników otrzymywanych za pomocą wybranych, łączonych technik analitycznych, tj. bezpośredni nastrzyk *vs.* SPME; GC-FID *vs.* HS-SPME-GCxGC-TOF/MS *vs. e*-nos wykorzystujący technikę ultraszybkiej GC; HS-SPME/MS *vs.* HS-SPME-GCxGC-TOF/MS; HS-SPME/MS *vs.* IR/MS. Stanowi to dużą wartość poznawczą przeprowadzonych badań. Doktorantka wykazała się także umiejętnością zastosowania odpowiednich narzędzi chemometrycznych w celu klasyfikacji badanych próbek.

Za **najcenniejsze** i **najważniejsze** osiągnięcia Doktorantki opisane w czterech przedstawionych publikacjach należy uznać:

1. Opracowanie procedury oznaczania 62 lotnych związków za pomocą GC-FID w układzie umożliwiającym nastrzyk na dwie kolumny chromatograficzne o różnej polarności (CPWax-57CB and DB-624) i niezależną detekcję przez dwa niezależne detektory FID. Okazuje się, że jedno ze, zdawałoby się, prostszych rozwiązań może być tym, które przyniesie zadowalającą odpowiedź. Rozwiązanie zapewniło zwiększoną wiarygodność pomiarów, a parametry takie jak liniowość, czułość, odtwarzalność i granica wykrywalności zapewniły zastosowanie metody do kontroli jakości próbek Baijiu. Użycie dodatkowego detektora FID nie zwiększa znacząco kosztów sprzętu, jednocześnie zwiększając pewność identyfikacji związków, umożliwiając rozdzielenie związków koeluujących i skracając czas o połowę w porównaniu do analiz z wykorzystaniem dwóch odrębnych chromatografów. Ortogonalna analiza dyskryminacyjna metodą częściowych najmniejszych kwadratów (OPLS-DA) nie zapewniła klasyfikacji próbek pod względem regionu, ale możliwe było odróżnienie rodzajów Baijiu pod kątem aromatu.
2. Porównanie dwóch systemów kolumn chromatograficznych w układzie HS-SPME-GCxGC-TOF/MS i wykazanie, że układ opierający się na zastosowaniu kolumny z fazą stacjonarną niepolarną (SLB-5) jako pierwszej i kolumny z fazą stacjonarną polarną (Supelcowax-10) jako drugiej zapewnia lepsze rozdzielenie związków lotnych, ponieważ więcej analitów jest wykrywanych podczas stosowania tej konfiguracji. Wskazana kombinacja kolumn zapewniła lepszą ortogonalność i moc separacji w ogólnym rozrachunku, aczkolwiek odwrotna konfiguracja zapewniła lepszą separację np. dla aldehydów. Do klasyfikacji Baijiu na podstawie otrzymanych danych, wykorzystano metodę chemometryczną OPLS-DA. Obie konfiguracje kolumn zapewniły doskonałą dyskryminację ze względu na aromat oraz pochodzenie geograficzne, jednak większa liczba wykrywanych związków przemawia na korzyść stosowania układu: niepolarna faza stacjonarna-polarna faza stacjonarna.
3. Wykazanie, że technika HS-SPME-GCxGC-TOF/MS opierająca się na układzie kolumn niepolarna faza stacjonarna-polarna faza stacjonarna zapewnia najlepszą klasyfikację próbek Baijiu pod katem typu aromatu i pochodzenia geograficznego, w porównaniu z opracowanymi metodami opierającymi się na GC-FID, SPME-MS i e-nos wykorzystujący technikę ultraszybkiej GC. Dowodzi to konieczności etapu rozdzielania

chromatograficznego lotnych związków, jeśli przedmiotem badań ma być określenie aromatu i pochodzenia geograficznego.

4. Uzyskanie 100 % poprawności klasyfikacji regionalnej (geograficznej) dla Baijiu o intensywnym aromacie w rejonów Sichuan, Heilongjiang oraz Jiangsu z zastosowaniem technik HS-SPME-GC oraz HS-SPME-GCxGC-TOF/MS.
5. Zaproponowanie HS-SPME/MS jako techniki badania tzw. *„odcisku palca*" lotnych związków i udowodnienie, że może ona lepiej klasyfikować napoje alkoholowe na bazie roślin C3 (ziemniak, żyto, pszenica) niż powszechnie stosowana technika spektrometrii mas stosunków izotopowych (IRMS). Klasyfikację ze względu na pochodzenie botaniczne z wykorzystaniem HS-SPME-MS zweryfikowano również poprzez zastosowanie sztucznej sieci neuronowej, otrzymując 100 % zgodność.
6. Zaproponowanie procedur, które po odpowiedniej adaptacji z powodzeniem mogą być wdrożone w laboratoriach przemysłowych i specjalistycznych służb kontrolnych do szybkiego i jednoznacznego określenia składu chemicznego w trakcie produkcji Baijiu, jak też eliminacji zafałszowań tego produktu.

Zadaniem recenzenta jest wyłowić także uchybienia i niejasności. Wywiązując się z tego obowiązku stwierdzam, że tekst zawiera nieliczne błędy literowe (naliczyłem ich 3). Poniżej pewne inne drobne błędy:

- W abstrakcie w języku polskim wspomina Pani o granicy oznaczalności związków LOD. Akronim LOD odnosi się do granicy wykrywalności.
- W abstrakcie używa Pani pojęcia *„rozdział*", a mamy do czynienia z *„rozdzielaniem"*.
- Abstrakt: Co oznaczają oznaczenia „rośliny C3 i C4"? Później, w tekście podaje Pani w nawiasach przykłady, ale to powinno być umieszczone już w abstrakcie.
- Wykaz skrótów i akronimów: OPLS-DA – brakuje wyjaśnienia akronimu „orthogonal".
- Rysunek 1.2.: Na rysunku przedstawiono 11 aromatów, a podpis wskazuje, że powinno ich być 12. Ciekawość nie pozwala mi nie zapytać, jaki jest ten brakujący aromat?
- Rysunek 3.1. Moim zdaniem powinna być tu informacja na temat przeprowadzonych analiz chemometrycznych. Jest to niezwykle ważny element badań przeprowadzonych przez Doktorantkę, a tu został pominięty, zubożając prezentację wykonanej pracy.
- Rysunek 3.2. i 3.4. Podpisy pod rysunkami są mało precyzyjne. Przede wszystkim to są chromatogramy otrzymane w wyniku próbek Baijiu, z wykorzystaniem technik, które Pani porównuje.

Mam też kilka zapytań dotyczących części eksperymentalnej i uzyskanych wyników:

1. Dlaczego w publikacji nr 2 (oznaczonej jako JFA2021) porównywano dwa zestawy różnych kolumn? Mam na myśli to, że w układzie niepolarna faza stacjonarna-polarna faza stacjonarna były to kolumny SLB-5 oraz Supelcowax-10, z kolei w układzie polarna faza stacjonarna-niepolarna faza stacjonarna były to kolumny Supelcowax10 i Rtx-5. Dlaczego nie porównano tych samych kolumn, w różnych konfiguracjach?
2. SPME-GCxGC-TOFMS z niepolarną fazą stacjonarną jako pierwszą zapewniło lepszą rozdzielczość (otrzymano więcej związków chemicznych). Jak można wyjaśnić to od strony mechanizmu rozdzielania? Dlaczego tak się stało?
3. Proszę Doktorantkę o zaprezentowanie najważniejszego osobistego osiągniecia badawczego realizowanej dysertacji.

Powyższe uwagi i sugestie nie mają wpływu na merytoryczną wartość pracy. Większość z nich ma charakter dyskusyjny. Spodziewam się, że uzyskam na nie odpowiedź podczas publicznej obrony. Jednocześnie uważam, że w świetle obowiązujących przepisów (Ustawa z dnia 20 lipca

2018 r *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* wraz z uzupełnieniami) przedstawiona rozprawa spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim i wnoszę o dopuszczenie p. **mgr inż. Xi He** do dalszych etapów postępowania celem uzyskania stopnia doktora nauk rolniczych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia.

Jednocześnie, ze względu na to, iż oceniania dysertacja ma charakter innowacyjny (łączy zagadnienia badań podstawowych z praktyką), a swoją interdyscyplinarnością i nowatorską tematyką łączy wiele wątków z zakresu nowoczesnej chemii analitycznej (unikatowe wykorzystanie technik łączonych i sprzężonych w oznaczaniu lotnych składników próbek), spożywczej i chemometrii jak też opublikowanie wyników badań w specjalistycznych czasopismach z listy JCR o wysokich wskaźnikach IF, wnoszę o **jej wyróżnienie**.

Toruń 26.05.2023 r

Bogusław Buszewski