

ROBERT DULIŃSKI, ŁUKASZ BYCZYŃSKI, INGA KWIECIEŃ,
ADRIAN KARBOWSKI

ANALIZA WYBRANYCH PARAMETRÓW BIOAKTYWNYCH CZARNEGO CZOSNKU UZYSKANEGO W KRÓTKIM TRYBIE FERMENTACJI

Streszczenie

Wprowadzenie. Czosnek (*Allium sativum* L.) ze względu na obecność związków siarkowych, w tym allilliny, S-allillocysteiny oraz wysoką zawartość związków polifenolowych charakteryzuje się wieloma właściwościami prozdrowotnymi. W celu wyeliminowania specyficznych, niekorzystnych – z punktu widzenia części konsumentów – cech organoleptycznych czosnek może zostać poddany specjalnej, niskotemperaturowej obróbce termicznej, określanej mianem starzenia. Proces ten powoduje hydrolizę poli- i oligosacharydów (fruktany) z udziałem wewnątrzkomórkowych enzymów (fermentacja) oraz powstanie produktów reakcji Maillarda (kondensacja cukrów z aminami). W rezultacie dochodzi do zmiany koloru, konsystencji, smaku oraz zapachu finalnego produktu i otrzymania tzw. czarnego czosnku. Cel badań stanowiło porównanie właściwości antyoksydacyjnych oraz poziomu sumy polifenoli, profilu sacharydów, zawartości wybranych witamin z grupy B i uwolnionych aminokwasów dwóch odmian czosnku surowego i czarnego. Doświadczenia przeprowadzono z wykorzystaniem komercyjnego urządzenia do skróconej fermentacji firmy TIROSS. Proces przebiegał w temperaturze 70 °C w czasie 192 godzin. Ilość uwolnionych aminokwasów oznaczano metodą z ninhydryną, zawartość polifenoli ustalono z zastosowaniem odczynnika Folina-Ciocalteu, właściwości antyoksydacyjne z wykorzystaniem wolnego rodnika DPPH, a zawartość wybranych witamin z grupy B oraz profil sacharydów technikami HPLC.

Wyniki i wnioski. Otrzymane wyniki wskazują na wzrost aktywności antyoksydacyjnej, sumy polifenoli oraz zawartości witaminy B2 przy jednoczesnym spadku poziomu wolnych aminokwasów i tiaminy w czosnku otrzymanym po procesie starzenia. Projekt jest wpisany w ogólnościowy trend związany z modelem odżywiania ukierunkowanego na dietę wegańską i poszukiwania nowych, prozdrowotnych składników czy receptur z surowców o już wstępnie potwierdzonych atrybutach, jako składniki żywności funkcjonalnej.

Słowa kluczowe: czosnek, fermentowany czosnek, witaminy B, antyoksydanty, HPLC

Dr hab., prof. URK. R. Duliński ORCID: 0000-0002-0370-2556; dr Ł. Byczyński ORCID: 0000-0001-8221-7120; Katedra Biotechnologii i Ogólnej Technologii Żywności, Wydział Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, ul. Balicka 122, 31-149 Kraków; dr I. Kwiecień ORCID: 0000-0002-9057-6198; Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków; mgr inż. A. Karbowski, Algitect, ul. Łódzka 22/27, 98-220 Zduńska Wola. Kontakt e-mail: robert.dulinski@urk.edu.pl

Wprowadzenie

Czosnek (*Allium sativum* L.), należący do rodziny *Alliaceae*, to jedna z najstarszych roślin wykorzystywanych w leczeniu i medycynie naturalnej [15]. Wykazuje liczne właściwości prozdrowotne, m.in. przeciwdziałając rozwojowi chorób nowotworowych, w tym układu sercowo-naczyniowego [9] czy rakowi jelita grubego [14, 17]. Swoje właściwości zawdzięcza m.in. obecności związków siarkowych, w tym allilliny, S-allillocysteiny (SAC) oraz wysokiej zawartości związków polifenolowych [2, 16, 19, 26]. Pewnym ograniczeniem aplikowania produktu, zarówno w zastosowaniach biomedycznych, jak i kulinarnych, jest charakterystyczny i odrzucający niektórych konsumentów specyficzny zapach i ostry smak, powodujący nierzadko kłopoty gastryczne przy zwiększonym spożyciu produktu [17]. W celu zniwelowania wymienionych cech główki czosnku poddaje się obróbce termicznej, co prowadzi w procesie spontanicznej fermentacji do zmiany kolorystyki oraz smaku i zapachu ekstraktu. W sensie chemicznym jest to powiązane z tworzeniem produktów reakcji Maillarda, przegrupowaniami Amadori, 5-hydrokso-metylofurfuralu (HMF) oraz przemianami polisacharydów, w tym dominującej w produkcie inulino-fruktanów [10, 15, 25]. Większość fermentacji stosowanych w badaniach i w praktyce kulinarnej trwa od kilku tygodni do 90 dni w podwyższonej temperaturze 70 °C oraz przy wilgotności względnej 70 ÷ 90 % [1]. Jakkolwiek z perspektywy zarówno producenta – zwróćmy uwagę na rosnący rynek, szacowany na ponad 100 mln dolarów w samych USA (2023 r.) – jak i konsumenta, ten czas może wydawać się stosunkowo długi. Powstaje zatem pytanie: czy można skrócić czas obróbki do niezbędnego minimum, zachowując przy tym wszystkie pożądane parametry bioaktywne związane z tym procesem fermentacji lub przynajmniej większość z nich?

Proces można przyspieszyć, stosując specjalne urządzenie pierwotnie przeznaczone do gotowania ryżu. W rezultacie otrzymano aparaturę do przeprowadzania skróconej fermentacji czosnku. Najczęściej tego rodzaju sprzęt zawiera aluminiową komorę, w której na specjalnej, wyjmowanej tacy kładzie się główki czosnku, całość natomiast zostaje zamknięta uszczelnioną pokrywą z zaworem odprowadzającym nadmiar wilgoci.

Sun i Wang w swojej pracy [22] stwierdzają, że ustawienie niższej temperatury procesu (75 °C), wysokiej wilgotności (85 %), jak również skrócenie czasu fermentacji do 8 dni działają pozytywnie w kwestii zachowania składników odżywczych, a to oznacza utrzymanie aktywności biologicznej składników czosnku. Z kolei Chua i wsp. [6] zaznaczają, że około 8. dnia fermentacji zauważa się istotny wzrost syntezy 5-hydrokso-metylofurfuralu, substancji o właściwościach antyoksydacyjnych. Jest to pięciowęglowy cykliczny aldehyd, który powstaje z monosacharydów w warunkach kwaśnych oraz w podwyższonej temperaturze. Z tego względu jego stężenie wzrasta przy pH poniżej 5. Istotny jednak jest fakt, że w wysokim stężeniu HMF staje się cyto-

toksyczny i wykazuje właściwości mutagenne i kancerogenne [23], dlatego skrócenie procesu starzenia może okazać się bardzo korzystne.

Celem pracy było określenie potencjału antyoksydacyjnego oraz zawartości wybranych składników bioaktywnych w czosnku surowym oraz fermentowanym z wykorzystaniem specjalnego naczynia do fermentacji w warunkach zoptymalizowanych parametrów hydrotermicznych.

W badaniach zaproponowano obserwacje z jednej strony standardowych parametrów, jak poziom cukrów prostych czy własności antyoksydacyjne, ale również monitorowanie szerokiego spektrum profilu sacharydów ze względu na wielkość cząsteczek oraz wyróżniki w postaci zmian głównych frakcji w trakcie procesu fermentacji. Oznaczono także zawartość aminokwasów, co stanowi kolejny istotny parametr w kontekście procesów chemicznych – m.in. przebiegu reakcji Maillarda – zachodzących w trakcie spontanicznej fermentacji czosnku.

Material i metody badań

Material badany

Materiałem do badań były świeże i otrzymane w procesie fermentacji ząbki czosnku odmiany Harnaś z uprawy ekologicznej oraz Violetta. Materiał zakupiono w lokalnym sklepie (odmiana Violetta) oraz pozyskano od konsorcjum Polski Czosnek *Silvia prima* (odmiana Harnaś). Czarny czosnek otrzymano metodą skróconej fermentacji w temperaturze 70 °C w czasie 192 godzin z wykorzystaniem urządzenia Tiross model TS906 (TIROSS, Polska). Następnie zarówno czarny, jak i surowy czosnek obrano i drobno posiekano nożem. W takiej postaci wykorzystano go do oznaczenia zawartości wody oraz wykonania ekstraktów.

Oznaczanie zawartości wody

Do pomiarów odważano 3 ÷ 5 g badanego materiału, a proces obejmował trzy etapy: początkowy, trwający 60 minut w 60 °C, drugi – 60 minut w 98 °C, studzenie w eksykatorze i pierwszy pomiar, dosuszanie w 105 °C, studzenie i ostatni pomiar. Na podstawie uzyskanych pomiarów obliczono zawartość wody w badanych obiektach.

Analizy spektroskopowe

Do ekstrakcji odważano po 1 g próbki do butelek z ciemnego szkła i zalewano 89 ml mieszaniny ekstrakcyjnej aceton: woda w stosunku 50:50. Butelki wytrząsano przez 3 godziny w temperaturze pokojowej, po czym ekstrakt przefiltrowywano przez sącdek ze średniej bibuły. Pozostały w butelce osad ponownie ekstrahowano 10 ml mieszaniny ekstrakcyjnej przez 30 minut i przesączano. Połączone ekstrakty wykorzystano do analizy aktywności antyoksydacyjnej, sumy polifenoli oraz aminokwasów.

Dla każdego obiektu wykonano trzy osobne ekstrakty, a dla każdego ekstraktu wykonywano trzy oddzielne próbki pomiarowe dla metod przedstawionych poniżej.

Pomiarów aktywności antyoksydacyjnej dokonano z zastosowaniem metanolewego (80 %) roztworu DPPH[•] w stężeniu 0,1 mM. Do pomiarów pobierano po 0,2 cm³ ekstraktów i 2,8 cm³ DPPH[•]. Dodatkowo wykonywano próby odniesienia – 0,2 cm³ 50-procentowego acetonu zamiast próbki oraz wzorce troloxu (syntetyczna pochodna witaminy E). Próbki umieszczano w ciemności, a pomiarów dokonywano po 30 minutach przy długości fali 516 nm stosując 80-procentowy metanol, jako próbę odniesienia. Aktywność zmiatania rodników hydroksylowych (%) obliczano ze wzoru: $((A_0 - A_1) / A_0) \times 100$, gdzie A_0 to absorbancja kontroli, a A_1 to absorbancja próbki. Wyniki wyrażono również jako ekwiwalent µg troloxu na gram próbki (µg trolox/g).

Zawartość fenoli rozpuszczalnych oznaczano w reakcji 0,1 i 0,2 cm³ ekstraktu w 5 cm³ wody z 0,25 cm³ odczynnika Folina-Ciocalteu. Po 5 minutach próbki neutralizowano 0,5 cm³ 25-procentowego NaCO₃. Pomiarów spektrofotometrycznych dokonywano po 30 minutach od dodania węglanu przy długości fali 765 nm. Dodatkowo wykonano pomiary wzorców, a wyniki wyrażono jako mg ekwiwalentu kwasu galusowego na gram próbki (mg GAE/g).

Ilościowego oznaczenia sumy aminokwasów dokonano z wykorzystaniem ninhydryny. Do 0,5 cm³ mieszaniny ekstrakcyjnej zawierającej 25 µl próbki dodawano 0,5 cm³ 0,4 M buforu octanowego o pH 5,5 oraz 2 cm³ odczynnika ninhydrynowego. Podobnie przygotowywano wzorce glicyny. Wszystkie próbki i wzorce umieszczano we wrzącej łaźni wodnej na 5 minut, następnie próbki schładzano i dodawano 6 cm³ 50-procentowego etanolu. Pomiarów absorbancji dokonywano przy długości fali 570 nm.

Analiza zawartości wybranych sacharydów oraz ich profilu

Do badań wykorzystano system chromatografii cieczowej UltiMate 3000. Chromatograf składał się z automatycznego nastrzykiwacza próbek (WPS-3000SL), pompy gradientowej (LPG-3400A), modułu z termostatem (3000SL), przetwornika analogowo-cyfrowego (UCI-50), detektora elektrochemicznego typ ED50a – wszystkie komponenty firmy Dionex-Thermo Corp (Sunnyvale, CA, USA) – oraz detektora indeksu refrakcji (Knauer model 2400i), ustawionego na parametry: 85 °C, RI@16x, 2 sek.

Analizy zawartości wybranych cukrów prostych przeprowadzono na kolumnie Rezex RCM (375mm x 4mm, Phenomenex) sprzężonej z detektorem RI w trybie izokratycznym z użyciem ultraczystej wody dejonizowanej (opór 18 mOhm), zgodnie z biuletynem Bio-Rad Aminex 1895. Dane zostały zebrane i przeanalizowane za pomocą oprogramowania Chromeleon 6.80.

Analizy profilu oligosacharydów przeprowadzono na kolumnie CarboPack PA100 sprzężonej z detektorem elektrochemicznym (pulsacyjna detekcja amperometryczna) na podstawie metody opisanej w pracy Dulińskiego i wsp. [7].

Analiza zawartości witamin B1 oraz B2

Oznaczenie witamin B1 i B2 zostało wykonane zgodnie z opisem w pracy Starzyńskiej-Janiszewskiej i wsp. [20]. Rozdział ryboflawiny i witaminy B1 (jako tiochromu) przeprowadzono techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconej fazie (kolumna Luna C18, 250 mm × 4 mm śr. wew. 5 μm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) izokratycznie z wykorzystaniem fazy ruchomej, składającej się z mieszaniny metanolu i 0,05 M octanu sodu (30:70 v/v) przy prędkości przepływu 1 cm³/min. Detektor fluorymetryczny został ustawiony na długość fal wzbudzenia 366 nm i emisji 435 nm dla witaminy B1 oraz 422 nm /533 nm w przypadku analiz witaminy B2. Konwersję tiaminy do tiochromu przeprowadzono pozakolumnowo z wykorzystaniem odczynników utleniających (0,1 % żelazicyjanek potasu w 12-procentowym wodorotlenku sodu podawane przez pompę perystaltyczną (Dionex ISO-3000) z przepływem 0,2 cm³/min) z wykorzystaniem uformowanej pętli reakcyjnej z teflonu o pojemności 750 μl (VICI-Valco, Houston, USA).

Analizy statystyczne

Uzyskane dane poddano jednoczynnikowej analizie wariancji (ANOVA) w celu wykrycia istotnych różnic między średnimi wyrażonymi jako średnia ± odchylenie standardowe (SD). Istotność różnic między poszczególnymi obiektami badawczymi oceniono z użyciem testu NIR przy $p < 0,05$. Analizy wykonano w programie Statgraphics Centurion 18 (Statgraphics Technologies, Inc., The Plains, Virginia, USA).

Wyniki i dyskusja

Wyniki analiz spektroskopowych oraz zawartości wody

Parametry, które oznaczono w próbkach fermentowanego czosnku, to m.in. suma polifenoli (ang. TPC - total phenolic content) oraz aktywność antyoksydacyjna wyrażona stopniem inhibicji tworzenia się kationorodnika z roztworu ABTS^{•+}. Testy te są powszechnie wykorzystywane do oceny własności antyutleniających szerokiej gamy produktów żywnościowych [22].

W przypadku analiz sumy rozpuszczalnych polifenoli najniższy poziom odnotowano w surowej odmianie czosnku Violetta (4,84 mg GAE/g). W przypadku tej odmiany czosnku proces fermentacji skutkował 4-krotnym wzrostem wskazanego wyżej parametru (18,6 mg GAE/g) (Tab. 1). Czosnek fermentowany Harnaś Eko charakteryzował się najwyższym poziomem tych bioaktywnych składników (19,33 g GAE/kg) – różnice te potwierdzono w testach statystycznych. W relacji do badań innych autorów,

np. Soto i wsp. [19], średni oznaczony poziom sumy polifenoli ogółem TPC (11,75 mg GAE/g) okazał się o około połowę niższy.

W testach na aktywność antyutleniającą mierzoną potencjałem do wygaszania wolnych rodników (DPPH[•]) w każdej z analizowanych odmian czosnku, w wariancie poddanym fermentacji stwierdzono istotnie większy potencjał antyoksydacyjny. Najniższą aktywność przeciwutleniającą wykazywały próbki czosnku surowego. Proces fermentacji zwiększał tę aktywność. W przypadku ekologicznej odmiany czosnku był to wzrost rzędu blisko 61 %. (Tab. 1). Analogiczne obserwacje poczyniono w przypadku czosnku Violetta i jego fermentowanej wersji, gdzie poziom ten wzrósł o 58 % w stosunku do kontroli, którą charakteryzowała wartość 10,5 % inhibicji.

Tabela. 1. Wybrane parametry bioaktywne oraz zawartość wody w surowym i fermentowanym czosnku odmian Harnaś i Violetta

Table. 1. Selected bioactive parameters and water content in the crude and fermented garlic varieties: Harnaś and Violetta

Nazwa próbki / Sample name	Zawartość wody [%] / Water content [%]	TPC [mg GAE/g s.m.] / TPC [mg GAE/g d.m.]	DPPH [% inhibicji] / DPPH [% inhibition]	Trolox [mg/g s.m.] / Trolox [mg/g d.m.]	Wolne aminokwasy [mg/g s.m.] / Free aminoacids [mg/g d.m.]
Surowy Violetta / Crude Violetta	65.28 ^c ± 1.21	4.84 ^a ± 0.50	10.50 ^a ± 1.65	6.12 ^a ± 0.60	60.94 ^c ± 3.22
Fermentowany Violetta / Fermented Violetta	32.73 ^a ± 1.09	18.65 ^b ± 0.36	68.62 ^c ± 0.85	20.62 ^b ± 0.90	13.16 ^a ± 1.52
Harnaś surowy / Crude Harnaś	64.15 ^c ± 1.18	4.19 ^a ± 0.41	13.24 ^b ± 1.71	7.22 ^a ± 0.67	61.95 ^c ± 3.66
Harnaś fermentowany / Fermented Harnaś	42.80 ^b ± 1.77	19.33 ^b ± 0.31	74.61 ^d ± 1.01	24.83 ^c ± 1.12	33.09 ^b ± 1.84

Objaśnienia / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie (\bar{x}) ± odchylenia standardowe (SD) n = 6; a, b, c, d – wartości średnie w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie przy $p \leq 0,05$ /

The table shows mean values (\bar{x}) ± standard deviations (SD) n = 6; mean values in columns, which are denoted by different letters, differ statistically significantly $p \leq 0.05$.

Najwyższy potencjał do usuwania wolnych rodników odnotowano w przypadku czosnku fermentowanego odmiany Harnaś, który był najbardziej skutecznym wariantem czosnku ze wszystkich testowanych w zakresie potencjału antyoksydacyjnego.

Oznaczony poziom zawartości wolnych aminokwasów w ekstraktach czosnku surowego i czarnego przedstawiono w tabeli 1. Zgodnie z oczekiwaniami, z uwagi na postępujące efekty reakcji Maillarda poświadczone zmianą barwy prób, obserwowano zmniejszenie zawartości aminokwasów po przeprowadzonym procesie fermentacji.

Odnotowano redukcję omawianych związków o ponad 40 % dla odmian Harnaś i Violetta, przy stosunkowo wysokim poziomie wolnych aminokwasów w czosnku surowym (około 60 ÷ 62 mg glicyny/g s.m.). Obniżenie zawartości aminokwasów w procesie otrzymywania czarnego czosnku potwierdzono także w innych pracach [5]. Autorzy zauważyli, że w gronie 16 badanych aminokwasów zawartość 12 ulegała zmniejszeniu, a były to: alanina, arginina, cysteina, glicyna, kwas asparaginowy, kwas glutaminowy, lizyna, histydyna, seryna, treonina, tyrozyna, walina.

Profil sacharydów

W badaniach techniką wysokosprawnej chromatografii wykluczenia cząsteczkowego zidentyfikowano główną frakcję o czasie retencji 20,1 min i masie cząsteczkowej poniżej 10 kDa, która obejmuje od 92,9 % (czosnek Violetta) do 94,2 % (czosnek odmiana Harnaś) całkowitego pola powierzchni pików. W trakcie procesu fermentacji odnotowano nieznaczne (2 ÷ 3 %), jakkolwiek istotne statystycznie obniżenie udziału tej frakcji w obrazie chromatograficznym z techniki HPSEC (Tab. 2). Można podejrzewać, że pik reprezentował szerokie spektrum cukrów, w tym również fruktooligosacharydów (tzw. inulin type-fructans), które według danych literaturowych [11] są jedną z głównych frakcji surowego czosnku (ok. 23 % świeżej masy) o masie cząsteczkowej 1 ÷ 10 kDa [1]. Z uwagi na szeroki zakres frakcjonowania zastosowanej kolumny nie udało się lepiej scharakteryzować tej frakcji.

Tabela 2. Zawartość wybranych cukrów prostych (mg/g) w ekstrakcie z czosnku oraz zawartość cukrów fermentowalnych (stopień depolimeryzacji 1-3) oznaczona na kolumnie Rezex RCM wyrażona jako całkowite pole powierzchni pików. Relatywne pole powierzchni głównego pików oznaczone techniką HPSEC (kolumna TSK-Gel GMPWX1)

Table 2. The content of the selected monosaccharides (mg/g) in garlic extracts and fermentable sugars (polymerization 1-3) analyzed on column Rezex RCM expressed as the total peak area. The relative area of the main peak analyzed by HPSEC (TSK-Gel GMPWX1 column)

Nazwa próbki / Sample name	Relatywne pole powierzchni głównego pików [%] / Relative main peak area [%]	DP1-3 [RAU mV·min]	Fruktoza Fructose	Glukoza Glucose
Surowy Harnaś	94.273 ^c ± 2.81	135.4 ^a ± 11.99	20.05 ^a ± 2.9	5.0 ^a ± 0.2
Harnaś fermentowany	87.07 ^b ± 0.84	231.31 ^b ± 13.45	240.25 ^c ± 10.86	48.0 ^b ± 7.6
Surowy Violetta	92.94 ^c ± 0.06	124.59 ^a ± 15.33	24.4 ^a ± 2.8	5.5 ^a ± 0.2
Violetta fermentowany	89.95 ^a ± 0.32	175.56 ^b ± 8.04	166.2 ^b ± 15.2	45.0 ^b ± 5.2

Objaśnienia / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie (\bar{x}) ± odchylenia standardowe (SD) n = 6; a, b, c, d – wartości średnie w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie przy $p \leq 0,05$ /

The table shows mean values (\bar{x}) \pm standard deviations (SD) $n = 6$; mean values in columns, which are denoted by different letters, differ statistically significantly $p \leq 0.05$.

Analizując profil cukrów fermentowalnych prostych, potwierdzono istotny, blisko 10-krotny wzrost zawartości fruktozy (57 % w całkowitym profilu) oraz porównywalny wzrost poziomu glukozy (6,7 % w całym spektrum sacharydów) (Tab. 2) w trakcie procesu fermentacji, co przyczynia się do słodkawego smaku finalnego produktu. Prawdopodobnie z uwagi na krótszy reżim czasowy i specyfikę procesu realizowanego w garnku do fermentacji Tiross szacowana całkowita zawartość cukrów redukujących jest po tym procesie nieco niższa (211 \div 288 mg/g) w relacji do czarnego czosnku pozyskanego w klasycznym, ale skróconym trybie obróbki termicznej (8 dni, 357,9 mg/g) [22] czy standardowym, kilkudziesięciodniowym czasie fermentacji (472 mg/g) [1].

Zawartość wybranych witamin z grupy B

Jeden ze sposobów wzbogacenia produktów spożywczych w witaminę B2 stanowi suplementacja surowca lub półproduktu oczyszczoną ryboflawiną. Jednak jeszcze korzystniejszą – z punktu widzenia biodostępności – opcją jest wzbogacenie naturalnymi składnikami poprzez fermentację. Z tego względu podejmowane były próby selekcji szczepów mikroorganizmów (*Lactobacillus fermentum*) wykorzystywanych w procesie fermentacji do uzupełnienia, zwiększenia puli ryboflawiny w jogurtach czy pieczywie [18]. Porównanie uzyskanych tam efektów wzbogacenia ryboflawiną (14 μ g/100 g) wykazało, że testowany w niniejszej pracy spontaniczny proces fermentacji proponuje istotny wzrost – o blisko 56 μ g/100 g – zawartości tego bioaktywnego składnika w produkcie końcowym (Tab. 3) w stosunku do poziomu odnotowanego w surowym czosnku (26 \div 31 μ g/100 g), który jest porównywalny z dostępnymi źródłami literaturowymi (20 μ g/100 g) [8]. W pracach innych autorów [13, 17] nie odnotowano znaczącego wpływu fermentacji na zawartość ryboflawiny, argumentując to związaniem aktywnych metabolicznie form witaminy B2 (ufosforylowane pochodne flawiny FMN, FAD) w kompleksach białkowych. W niniejszej pracy zaobserwowano istotny wzrost o 60 %, co być może wynikało z odmiennych warunków przeprowadzenia procesu, realizowanego w specjalnym naczyniu. Jednocześnie można dyskutować, czy przy takich warunkach hydrotermicznych i sprzyjających aktywności endogennych enzymów w trakcie procesu, teza o uwolnieniu ryboflawiny z kompleksów fosforano-białkowych nie jest bardziej prawdopodobna.

W przypadku witaminy B1 nie odnotowano pozytywnego wpływu procesu fermentacji na jej zawartość w czosnku, zaobserwowano tendencję związaną z obniżeniem w zakresie 75 \div 79 μ g tiaminy /100 g produktu (Tab. 3). Jest to prawdopodobnie efekt obróbki hydrotermicznej, która nie jest obojętna dla struktury pochodnej tiazolowej formującej cząsteczkę witaminy B1 [24]. Jakkolwiek nie można również wyklu-

czyć scenariusza, w którym allicyna produkowana w procesie fermentacji przez enzym allinazę tworzy kompleksy z pewną pulą witaminy B1, formując cząsteczkę allitiaminy, jak to jest sugerowane w niektórych źródłach literaturowych [3, 4]. Ten produkt kondensacji w badaniach na komórkach wykazuje pozytywne właściwości w aspekcie regulacji poziomu cukru we krwi [4].

Tabela 3. Zawartość wybranych witamin z grupy B ($\mu\text{g}/100\text{g}$) w surowym i fermentowanym czosnku odmian Harnaś i Violetta

Table 3. The content of the selected vitamins from B group ($\mu\text{g}/100\text{g}$) in the crude and fermented garlic varieties: Harnaś and Violetta

Nazwa próbki /Sample name	Ryboflawina Riboflavin	Tiamina Thiamine
Surowy Violetta/ crude Violetta	26.11 ^a \pm 0.30	191.17 ^b \pm 3.09
Surowy Harnaś / crude Harnaś	31.29 ^a \pm 1.70	181.04 ^b \pm 4.30
Fermentowany Harnaś / fermented Harnaś	124.52 ^c \pm 7.36	117.17 ^a \pm 3.48
Fermentowany Violetta / fermented Violetta	82.06 ^b \pm 5.48	112.31 ^a \pm 16.53

Objaśnienia / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie (\bar{x}) \pm odchylenia standardowe (SD) $n = 6$; a, b, c, d – wartości średnie w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie przy $p \leq 0,05$ /

The table shows mean values (\bar{x}) \pm standard deviations (SD) $n = 6$; mean values in columns, which are denoted by different letters, differ statistically significantly $p \leq 0.05$.

Zawarte w niniejszej pracy badania wstępnie potwierdzają, że krótszy czas fermentacji jest wystarczający dla formowania jakości czarnego czosnku. Opinia ta poparta jest również eksperymentami, które opisano w publikacji Sun i wsp., w której autorzy wskazują, że utrzymanie temperatury 75 °C i wilgotności względnej 85 % przez 8 dni było optymalne, aby czarny czosnek zachował zdolność antyoksydacyjną i istotne składniki odżywcze [21]. W podobnym tonie wypowiadają się autorzy kolejnego badania [12], którzy wskazali możliwość skrócenia czasu dojrzewania/fermentacji z 45 do 13 dni, jak również wykazali, że aktywność biologiczna czarnego czosnku o krótkim okresie dojrzewania (13 dni) jest wyższa niż czarnego czosnku po dłuższej fermentacji, a nawet wyższa niż surowego, białego czosnku.

Wnioski

1. W wyniku zastosowania krótkiego trybu fermentacji czosnku w dedykowanym naczyniu odnotowano:

- (1) Wzrost aktywności antyoksydacyjnej wyrażonej jako zdolność do inhibicji wolnego rodnika DPPH oraz sumy polifenoli;
- (2) Podwyższenie zawartości ryboflawiny;

- (3) Obniżenie zawartości wolnych aminokwasów i witaminy B1 w czosnku otrzymanym po procesie starzenia.
2. W celu dokładniejszego scharakteryzowania zmian w obrębie frakcji oligosacharydów konieczne będzie zastosowanie selektywnych kolumn do frakcjonowania w niższym zakresie mas cząsteczkowych.
3. Reasumując, skrócenie czasu fermentacji czosnku z kilkudziesięciu do 8 dni zastosowane w niniejszej pracy, nadal pozwala na uzyskanie istotnego wzrostu potencjału bioaktywnego, którego ostatecznym potwierdzeniem będzie planowana kolejna faza projektu związana z oznaczeniem związków alkilosiarczkowych.

Finansowanie

Publikacja była finansowana w ramach Badań zamawianych - wnioski nr BZ-4760/2022.

Literatura

- [1] Afzaal M., Saeed F., Rasheed R.: Nutritional, biological, and therapeutic properties of black garlic: a critical review. *Int. J. Food Prop.*, 2021,24(1):1387-1402.
- [2] Ammelia S.M., Suharti, Retnosari R., Utomo Y., Sukarianingsih D., Wonorahardjo S.: The changing profiles of organosulfuric compounds during black garlic processing. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci.*, 2020,475(1).
- [3] Balqis W., Lukiati B, Amin M.: Active Compounds with Antioxidant Potential in Boiled Local Papua-Indonesian Garlic. In: Siswanto D, Mastuti R, Huyop FZB, Treesubsumtorn C, eds. *9th International Conference on Global Resource Conservation (ICGRC) and Aji From Ritsumeikan University*. Vol 2019. AIP Conference Proceedings, 2018.
- [4] Biro A, Markovics A, Fazekas M.E.: Allithiamine Alleviates Hyperglycaemia-Induced Endothelial Dysfunction. *Nutrients*, 2020,12(6).
- [5] Choi I.S., Cha H.S., Lee Y.S.: Physicochemical and Antioxidant Properties of Black Garlic. *Molecules*, 2014,19(10), 16811-16823.
- [6] Chua L.S., Abdullah F.I., Lim S.H.: Physicochemical changes and nutritional content of black garlic during fermentation. *Appl. Food Res.*, 2022,2(2), #100216.
- [7] Duliński R., Zdaniewicz M., Pater A., Poniewska D., Żyła K.: The impact of phytases on the release of bioactive inositols, the profile of inositol phosphates, and the release of selected minerals in the technology of buckwheat beer production. *Biomolecules*, 2020,10(2).
- [8] Gambelli L., Marconi S., Durazzo A.: Vitamins and minerals in four traditional garlic ecotypes (*Allium sativum* L.) from Italy: An example of territorial biodiversity. *Sustain.*, 2021,13(13).
- [9] Liu J., Zhang G., Cong X., Wen C.: Black garlic improves heart function in patients with coronary heart disease by improving circulating antioxidant levels. *Front Physiol.*, 2018, 9, 1-11.
- [10] Lu X., Li N., Zhao R.: In vitro Prebiotic Properties of Garlic Polysaccharides and Its Oligosaccharide Mixtures Obtained by Acid Hydrolysis. *Front Nutr.*, 2021,8, 0-4.
- [11] Martínez-Casas L., Lage-Yusty M., López-Hernández J.: Changes in the Aromatic Profile, Sugars, and Bioactive Compounds When Purple Garlic Is Transformed into Black Garlic. *J. Agric. Food Chem.*, 2017,65(49), 10804-10811.

- [12] Medina M.Á.T., Merinas-Amo T., Fernández-Bedmar Z.: Physicochemical Characterization and Biological In Vitro Assays. *Foods*, 2019, 8(220), 1-18.
- [13] Montaña A., Casado F.J., De Castro A., Sánchez A.H., Rejano L.: Vitamin content and amino acid composition of pickled garlic processed with and without fermentation. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52(24), 7324-7330.
- [14] Moreno-Ortega A., Pereira-Caro G., Ordóñez J.L.O., Moreno-Rojas R., Ortiz-Somovilla V.: Bioaccessibility of bioactive compounds of gastrointestinal digestion. *Foods*, 2020, 9, #1582.
- [15] Najman K., Król K., Sadowska A.: The Physicochemical Properties, Volatile Compounds and Taste Profile of Black Garlic (*Allium sativum* L.) Cloves, Paste and Powder. *Appl Sci.*, 2022,12(9), 1-19.
- [16] Najman K., Sadowska A., Hallmann E.: Influence of thermal processing on the bioactive, antioxidant, and physicochemical properties of conventional and organic agriculture black garlic (*Allium sativum* L.). *Appl Sci.*, 2020,10(23), 1-17.
- [17] Qiu Z., Zheng Z., Zhang B., Sun-Waterhouse D., Qiao X.: Formation, nutritional value, and enhancement of characteristic components in black garlic: A review for maximizing the goodness to humans. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 2020, 19(2), 801-834.
- [18] Russo P., Capozzi V., Arena M.P.: Riboflavin-overproducing strains of *Lactobacillus fermentum* for riboflavin-enriched bread. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2014, 98(8), 3691-3700.
- [19] Soto V.C., González R.E., Sance M.M., Galmarini C.R.: Organosulfur and phenolic content of garlic (*Allium sativum* L.) and onion (*Allium cepa* L.) and its relationship with antioxidant activity. *Acta Hort.*, 2016, 1143, 277-290.
- [20] Starzynska-Janiszewska A., Dulinski R., Stodolak B., Mickowska B., Wikiera A.: Prolonged tempe-type fermentation in order to improve bioactive potential and nutritional parameters of quinoa seeds. *J. Cereal Sci.*, 2016, 71, 116-121.
- [21] Sun Y.E., Wang W.: Study on the interaction of bioactive compound S-allyl cysteine from garlic with serum albumin. *J. Food Drug. Anal.*, 2017, 25(2), 385-390.
- [22] Sun Y.E., Wang W.: Changes in nutritional and bio-functional compounds and antioxidant capacity during black garlic processing. *J. Food Sci. Technol.*, 2018, 55(2), 479-488.
- [23] Surh Y.J., Liem A., Miller J.A., Tannenbaum S.R.: 5-Sulfoxymethylfurfural as a possible ultimate mutagenic and carcinogenic metabolite of the Maillard reaction product, 5-hydroxymethylfurfural. *Carcinogenesis*, 1994, 15(10), 2375-2377.
- [24] Wolak N., Zawrotniak M., Gogól M., Kozik A., Rapała-Kozik M.: Vitamins B1, B2, B3 and B9: occurrence, biosynthesis pathways and functions in human nutrition. *Mini-Reviews Med. Chem.*, 2017, 17(12), 1075-1111.
- [25] Yuan H., Sun L., Chen M., Wang J.: An analysis of the changes on intermediate products during the thermal processing of black garlic. *Food Chem.*, 2018, 239, 56-61.
- [26] Yudhistira B., Punthi F., Lin J.A., Sulaimana A.S., Chang C.K., Hsieh C.W.: S-Allyl cysteine in garlic (*Allium sativum*): Formation, biofunction, and resistance to food processing for value-added product development. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 2022, 21(3), 2665-2687.

THE ANALYSIS OF THE SELECTED BIOACTIVE PARAMETERS OF BLACK GARLIC PREPARED IN THE SHORT FERMENTATION MODE

S u m m a r y

Background. Garlic (*Allium sativum* L.) is characterized by many health-promoting properties due to the presence of sulfur compounds, including allillin, S-allyllocysteine and the high content of polyphenolic compounds. In order to eliminate specific organoleptic characteristics – unfavorable from some consu-

mers' point of view, garlic can be subjected to a special, low-temperature heat treatment, referred to as aging. This process results in the hydrolysis of poly- and oligosaccharides (fructans) with the participation of intracellular enzymes (fermentation) and the formation of Maillard reaction products (condensation of sugars with amines). As a result, the color, consistency, taste and smell of the final product change and the so-called black garlic is obtained. The aim of the study was to compare the antioxidant properties and the level of total polyphenols, saccharide profile, the content of selected B vitamins and released amino acids of two varieties of raw and black garlic. The experiments were carried out with the use of a commercial short-term fermentation unit from TIROSS. The process was carried out at 70 °C for 192 hours. The amount of released amino acids was determined by the ninhydrin method, the content of polyphenols was found using the Folin-Ciocalteu reagent, antioxidant properties were specified using DPPH free radical and the content of vitamin B and saccharide profile by HPLC.

Results and conclusions. The results obtained indicate not only an increase in antioxidant activity, the sum of polyphenols and riboflavin, but also a decrease in the level of free amino acids and thiamine in the garlic obtained after the aging process. The project is in line with a global trend related to the nutrition model oriented towards a vegan diet and the search for new, health-promoting ingredients or recipes based on raw materials with already pre-confirmed attributes as ingredients of functional food.

Key words: garlic, fermented garlic, vitamins B, antioxidants, HPLC 