



Krka, d. d., Novo mesto



Gimnazija Novo mesto

ČRNI ČESEN

(raziskovalna naloga s področja kemije)

Avtorici:

Pia Olga Šepec

Eva Urankar

Mentorja:

mag. Branka Klemenčič

doc. dr. Aleš Gasparič

Novo mesto, april 2024

IZJAVA

Podpisani Pia Olga Šepec in Eva Urankar, dijakinji četrtega letnika Gimnazije Novo mesto, potrjujeva, da je raziskovalna naloga s področja kemije z naslovom

Črni česen

nastala kot rezultat lastnega raziskovalnega dela, da so vsi izsledki in rezultati korektno navedeni in da pri pisanju niso bile kršene avtorske in intelektualne pravice drugih.

Pia Olga Šepec



Eva Urankar



Mentorja:

doc. dr. Aleš Gasparič

mag. Branka Klemenčič

POVZETEK

Česen je zelo pogost v naši vsakdanji prehrani, predvsem zaradi svojih pozitivnih učinkov na zdravje. V zadnjih letih so čedalje bolj prisotni tudi različni pripravki iz česna, saj nimajo tako močnega vonja in okusa, mnogi pa trdijo, da so celo koristnejši za zdravje. Eden od njih je črni česen, ki je zaradi svojega zanimivega okusa in enostavne priprave pogost predvsem v kulinariki. Naš namen je bil optimizirati in spremljati proces priprave črnega česna. Spremljali smo snovne spremembe, ki potečejo med pretvorbo česna, in jih analizirali. S pomočjo tankoplastne kromatografije smo primerjali vsebnosti sladkorjev skozi pretvorbo česna. Koncentracije melanoidinov in polifenolov smo analizirali z UV-VIS spektrofotometrijo, medtem ko smo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti spremljali in potrdili prisotnost 5-hidroksimetilfurfurala v črnem česnu.

Ključne besede: črni česen, 5-hidroksimetilfurfural, melanoidini, polifenoli, sladkorji, HPLC, TLC, UV-VIS spektrofotometrija

ABSTRACT

Garlic is very common in our everyday diet, mainly due to its positive effects on our health. In recent years different garlic preparations are increasingly present, as they do not have such strong smell and taste. Many also claim they have more health benefits than regular garlic, one of these being black garlic, which is common in culinary due to its interesting flavour and simple preparation. The purpose of our research was to optimise and monitor the process of black garlic preparation. We monitored and analysed changes in components, which happen during the ageing process. We compared the content of sugars in garlic throughout the transformation with thin layer chromatography. We analysed the concentration of melanoidins and polyphenols with UV-VIS spectroscopy, while monitoring and confirming the presence of 5-hydroxymethylfurfural in black garlic with high pressure liquid chromatography.

Key words: black garlic, 5-hydroxymethylfurfural, melanoidins, polyphenols, sugars, HPLC, TLC, UV-VIS spectroscopy

ZAHVALA

Pri oblikovanju raziskovalne naloge sva bili deležni številne pomoči, ki je enostavno ne moreva spregledati. Še posebej se zahvaljujemo:

- mentorju dr. Alešu Gaspariču za usmerjanje pri izvedbi eksperimentalnega dela, za pomoč pri izbiri metod, ki bi jih lahko uporabili v najini raziskovalni nalogi, za pomoč pri iskanju primerne literature, razlago teoretičnega ozadja metod, ki smo jih uporabili, za pomoč pri pisanju naloge in razlago rezultatov;
- zahvalili bi se tudi drugim sodelavcem v tovarni zdravil Krka, d. d., Tanji Koleša, Anji Pucer Janež in Timoteju Zaletelju, ki so pomagali usmerjati eksperimentalno delo in sprotno razlagali temelje najine raziskovalne naloge;
- mentorici mag. Branki Klemenčič za vzpodbudo pri oblikovanju naloge, za usmerjanje pri pisanju raziskovalne naloge, za pomoč pri izvedbi HPLC, za pomoč pri izbiri literature, za pomoč pri interpretaciji rezultatov ter vsebinski pregled. Ob vsem tem pa bi se ji radi še posebej zahvalili za potrpežljivost in za vso moralno podporo pri pisanju raziskovalne naloge;
- profesorici Tanji Gačnik za usmerjanje pri pisanju raziskovalne naloge in vsebinski pregled,
- Katarini Sluga Zupančič za vestno nabavo potrebnih in ustreznih kemikalij;
- Tovarni zdravil Krka, d. d., ki nama je omogočila izvajanje eksperimentalnega dela v svojih laboratorijih in uporabo svojih materialov ter opreme;
- vodstvu Gimnazije Novo mesto za spodbudno okolje in uporabo kemijskega laboratorija pri eksperimentalnem delu;
- profesorici Suzani Krvavici za lektoriranje naloge in
- profesorju Janezu Gorencu za lektoriranje povzetka v angleškem jeziku.

Ob tem bi se radi zahvalili tudi najinim staršem, ki so naju med raziskovanjem in pisanjem spodbujali ter verjeli v naju.

KAZALO

IZJAVA.....	I
POVZETEK.....	II
ABSTRACT.....	II
ZAHVALA.....	III
KAZALO.....	IV
KAZALO TABEL.....	VII
KAZALO SLIK.....	VII
KAZALO GRAFOV.....	VIII
KAZALO ENAČB.....	IX
SLOVAR KRATIC IN IZRAZOV.....	IX
1 UVOD.....	1
1.1 ČESEN (<i>Allium sativum</i>).....	1
1.1.1 ZGODOVINA ČESNA.....	1
1.1.2 OPIS.....	1
1.1.3 ZNANSTVENA KLASIFIKACIJA.....	2
1.1.4 OPIS RASTLINE.....	2
1.1.5 SESTAVA.....	3
1.1.5.1 OGLJIKOVI HIDRATI.....	3
1.1.5.2 BELJAKOVINE.....	4
1.1.5.3 ALICIN.....	4
1.1.5.4 ALIIN.....	5
1.1.5.5 VITAMIN A.....	5
1.1.5.6 VITAMIN B.....	6
1.1.5.7 VITAMIN C.....	6
1.1.6 UPORABA.....	7
1.1.6.1 UPORABA V HRANI.....	7
1.1.6.2 UPORABA V ZDRAVSTVENE NAMENE IN ZDRAVILNI UČINKI.....	7
1.1.7 NEŽELENI UČINKI.....	8
1.2 ČRNI ČESEN.....	8
1.2.1 ZGODOVINA.....	8
1.2.2 OPIS.....	9
1.2.3 PROCES NASTANKA.....	9

1.2.3.1	KARAMELIZACIJA.....	10
1.2.3.2	MAILLARDOVA REAKCIJA.....	10
1.2.4	SESTAVA.....	11
1.2.4.1	VITAMIN B3.....	12
1.2.4.2	VITAMIN B6.....	12
1.2.5	PRIMERJAVA S SVEŽIM ČESNOM.....	13
1.2.5.1	5-HIDROKSIMETILFURFURAL.....	14
1.2.5.2	MELANOIDINI.....	15
1.2.5.3	POLIFENOLI.....	15
1.2.5.4	GALNA KISLINA.....	15
1.2.6	UPORABA.....	16
1.2.6.1	UPORABA V HRANI.....	16
1.2.6.2	UPORABA V ZDRAVSTVENE NAMENE IN ZDRAVILNI UČINKI.....	16
1.3	METODE DELA.....	16
1.3.1	EKSTRAKCIJA.....	16
1.3.1.1	ULTRAZVOČNA EKSTRAKCIJA.....	17
1.3.2	CENTRIFUGIRANJE.....	17
1.3.3	TANKOPLASTNA KROMATOGRFIJA TLC.....	18
1.3.4	LIOFILIZACIJA.....	19
1.3.5	HPLC.....	19
1.3.6	UV-VIS SPEKTROSKOPIJA.....	21
2	NAMEN DELA.....	23
2.1	CILJI.....	23
2.2	HIPOTEZE.....	23
2.3	SHEMA DELA.....	24
2.4	NAČRT DELA.....	24
3	EKSPERIMENTALNO DELO.....	25
3.1	PRIPRAVA VZORCEV ČRNEGA ČESNA.....	25
3.2	MATERIALI.....	26
3.2.1	PRIPOMOČKI IN NAPRAVE.....	26
3.2.2	KEMIKALIJE.....	28
3.3	POSTOPKI.....	29
3.3.1	PRIPRAVA VODNIH EKSTRAKTOV.....	29

3.4	DOLOČANJE SLADKORJEV S POMOČJO TANKOPLASTNE KROMATOGRAFIJE ...	30
3.4.1	PRIPRAVA STANDARDOV.....	30
3.4.2	PRIPRAVA VZORCEV	31
3.4.3	PRIPRAVA MOBILNE FAZE IN KROMATOGRFSKE KADI	31
3.4.4	PRIPRAVA TLC PLOŠČ in RAZVIJANJE KROMATOGRAMOV	31
3.5	LIOFILIZACIJA.....	32
3.6	DOLOČANJE MELANOIDINOV IN POLIFENOLOV Z UV-VIS SPEKTROSKOPIJO...	33
3.6.1	PRIPRAVA METANOLNIH EKSTRAKTOV	33
3.6.2	MELANOIDINI	35
3.6.3	POLIFENOLI	35
3.6.3.1	PRIPRAVA RAZTOPIN GALNE KISLINE ZA UMERITVENO KRIVULJO	36
3.6.3.2	VZORCI.....	37
3.7	DOLOČANJE 5-HIDROKSIMETILFURFURALA S HPLC	40
3.7.1	PRIPRAVA STANDARDA ZA HPLC ANALIZO.....	41
3.7.2	PRIPRAVA VZORCEV ZA HPLC ANALIZO.....	41
4	REZULTATI.....	42
4.1	TLC.....	42
4.2	UV-VIS SPEKTROSKOPIJA	45
4.2.1	MELANOIDINI	45
4.2.1.1	ABSORBANCA PRI 280 nm.....	45
4.2.1.2	ABSORBANCA PRI 60 °C PRI 280 nm.....	46
4.2.1.3	ABSORBANCA PRI 70, 80, 90°C PRI 280 nm	46
4.2.1.4	ABSORBANCA PRI 360 nm.....	46
4.2.1.5	ABSORBANCA PRI 60 °C PRI 360 nm.....	47
4.2.1.6	ABSORBANCA PRI 70, 80, 90°C PRI 360 nm.....	47
4.2.1.7	ABSORBANCA PRI 420 nm.....	47
4.2.1.8	ABSORBANCA PRI 60 °C PRI 420 nm.....	48
4.2.1.9	ABSORBANCA PRI 70, 80, 90 °C PRI 420 nm.....	48
4.2.2	POLIFENOLI	49
4.3	REZULTATI HPLC ANALIZE.....	52
5	RAZPRAVA.....	59
6	ZAKLJUČEK.....	63
7	VIRI.....	64

7.1 BIBLIOGRAFIJA	64
7.2 VIRI SLIK.....	68

KAZALO TABEL

Tabela 1: znanstvena klasifikacija česna (Bionity, brez datuma)	2
Tabela 2: priprava vzorcev črnega česna	25
Tabela 3: rezultati tehtanja in razlike v masi pred liofilizacijo in po njej.....	32
Tabela 4: povprečna masa 50 mL centrifugirk	33
Tabela 5: masne bilance metanolnih ekstraktov.....	34
Tabela 6: redčitvena vrsta galne kisline	36
Tabela 7: vzorci na plošči za UV-VIS spektroskopijo.....	38
Tabela 8: končna plošča za UV-VIS spektroskopijo.....	39
Tabela 9: gradientna elucija	41
Tabela 10: masna koncentracija raztopin standardov.....	41
Tabela 11: pozicije vzorcev na plošči TLC 1.....	42
Tabela 12: pozicije vzorcev na plošči TLC 2.....	43
Tabela 13: pozicije vzorcev na plošči TLC 3.....	44
Tabela 14: izračuni koncentracij polifenolov	50
Tabela 15: izračuni vsebnosti polifenolov v miligramih na gram česna.....	52
Tabela 16: izračun povprečnega retenzijskega časa pri posameznem standardu in površin pika pri povprečnem retenzijskem času.....	53
Tabela 17: ocena vsebnosti 5-HMF.....	58

KAZALO SLIK

Slika 1: rastlina česen.....	2
Slika 2: skeletna formula alicina	4
Slika 3: skeletna formula aliina	5
Slika 4: skeletna formula vitamina C.....	7
Slika 5: črni česen	8
Slika 6: videz česna pri staranju	9
Slika 7: shema Maillardove reakcije.....	11
Slika 8: skeletna formula vitamina B3.....	12
Slika 9: skeletna formula vitamina B6.....	13
Slika 10: sveži in črni česen	13
Slika 11: skeletna formula 5-hidroksimetilfurfurala.....	14
Slika 12: skeletna formula galne kisline	15
Slika 13: centrifugiranje.....	17
Slika 14: TLC.....	19
Slika 15: HPLC sistem	20

Slika 16: : poenostavljena shema UV-VIS spektrofotometrije.....	22
Slika 17: shema dela	24
Slika 18: priprava vzorcev črnega česna v šolskem sušilniku.....	26
Slika 19: tehtanje	Slika 20: priprava vodnih ekstraktov
	29
Slika 21: delovna površina.....	30
Slika 22: vodni ekstrakti	30
Slika 23: kromatografska kad z mobilno fazo	Slika 24: sušenje TLC
plošče	32
Slika 25: ultrazvočna kopel.....	34
Slika 26: filtriranje	35
Slika 27: plošča s standardnimi raztopinami po uporabi Folin in Ciocalteu fenol reagenta	37
Slika 28: vzorci na plošči za spektroskopijo	39
Slika 29: šolski HPLC sistem.....	40
Slika 30: TLC plošča s standardi, vzorcem svežega česna (00) in prvimi šestimi vzorci (01, 02, 03, 03 R, 04, 04 R, 11, 12)	42
Slika 31: TLC plošča s standardi, vzorcem svežega česna (00) in naslednjimi petimi vzorci (13, 13 R, 14, 14 R, 21, 22, 23, 23 R).....	43
Slika 32: TLC plošča s standardi, vzorcem svežega česna (00) in vzorci 24, 24 R, 25, 25 R, 31, 31 R, 32, 32 R.....	44

KAZALO GRAFOV

Graf 1: prikaz absorbance vzorcev pri valovni dolžini 280 nm.....	45
Graf 2: prikaz absorbance redčenih vzorcev črnega česna v različnih časovnih intervalih obdelanega na 60 °C pri 280	46
Graf 3: absorbanca pri 280 nm po dnevih pri redčenih vzorcih	46
Graf 4: prikaz absorbance vzorcev pri valovni dolžini 360 nm.....	46
Graf 5: prikaz absorbance redčenih vzorcev črnega česna v različnih časovnih intervalih obdelanega na 60 °C pri 360 nm.....	47
Graf 6: absorbanca pri 360 nm po dnevih pri redčenih vzorcih	47
Graf 7: prikaz absorbance vzorcev pri valovni dolžini 420 nm.....	47
Graf 8: prikaz absorbance redčenih vzorcev črnega česna v različnih časovnih intervalih obdelanega na 60 °C pri 420 nm.....	48
Graf 9: absorbanca pri 420 nm po dnevih pri redčenih vzorcih	48
Graf 10: umeritvena premica za galno kislino	49
Graf 11: prikaz absorbance vzorcev z reagenti pri 765 nm	49
Graf 12: masa polifenolov v vzorcih črnega česna.....	51
Graf 13: kromatogram standarda 5-HMF.....	52
Graf 14: umeritvena krivulja A (Area) od koncentracije 5-HMF.....	53
Graf 15: kromatogram vzorca 01	55
Graf 16: kromatogram vzorca 02	55
Graf 17: kromatogram vzorca 03	56

Graf 18: kromatogram vzorca 04	56
Graf 19: kromatogram vzorca 00	57
Graf 20: ocena vsebnosti 5-HMF liofiliziranega česna	59

KAZALO ENAČB

Enačba 1: enačba za izračun retenzijskega faktorja	18
Enačba 2: Lambert-Beerov zakon	37
Enačba 3: enačba za izračun koncentracije polifenolov po redčitvi	49
Enačba 4: enačba za izračun koncentracije v začetnem vzorcu	50
Enačba 5: enačba za izračun, koliko mg česna je v mL metanolnega ekstrakta	51
Enačba 6: enačba za izračun masne koncentracije	51
Enačba 7: enačba za izračun mase polifenolov na gram česna	51
Enačba 8: enačba umeritvene krivulje 5-HMF	57
Enačba 9: izračun količine 5-HMF	58

SLOVAR KRATIC IN IZRAZOV

- **RSS** – skupina z žveplovimi spojinami
- **5-HMF** – 5-hidroksimetilfurfural
- **HMF** – hidroksimetilfurfural
- **IUPAC** (iz ang. »*International Union of Pure and Applied Chemistry*«) – Mednarodna zveza za čisto in uporabno kemijo
- **Superživilo** – živilo, ki ima izjemne hranilne snovi in nas varuje pred boleznimi
- **LLE** (iz ang. »*liquid-liquid extraction*«) – ekstrakcija tekočih vzorcev
- **UAE** (iz ang. »*ultrasound-assisted extraction*«) – ultrazvočna ekstrakcija
- **TLC** (iz ang. »*thin-layer chromatography*«) – tankoplastna kromatografija
- **UV** (iz ang. »*ultraviolet*«) – ultravijolična
- **R_f** – retenzijski faktor
- **HPLC** (iz ang. »*high-performance liquid chromatography*«) – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
- **VIS** (iz ang. »*visible*«) – vidna
- **UV-VIS** (iz ang. »*ultraviolet-visible*«) – ultravijolična vidna
- **T** – temperatura
- **CAS** (iz ang. »*Chemical Abstracts Service Number*«) – številka iz mednarodnega seznama odkritih snovi

- **R** – reagenti (Folin in Ciocalteu reagent in natrijev karbonat)
- **R** – redčen
- **G** – galna kislina
- **G** – gravitacijska sila
- **MeOH** – metanol
- ϵ – molarni absorpcijski koeficient
- **l** – dolžina poti svetlobe skozi absorpcijsko sredstvo
- **c** – množinska koncentracija
- **A** – absorbanca
- **A** (iz ang. »area«) – površina
- **V** – volumen
- **V** – voda
- **E1** – redčitev 1
- **E2** – redčitev 2
- **E3** – redčitev 3
- **E4** – redčitev 4
- **Su** – saharoza
- **Gl** – glukozni sirup
- **Fr** – fruktoza
- **Ma** – maltoza
- **Ar** – arabinoza
- **n** – začetna vrednost
- **k** – strmina umeritvene premice
- c_k – koncentracija po redčitvi
- c_o – začetne koncentracije polifenolov
- γ_o – masna koncentracija polifenolov
- γ – masna koncentracija 5-HMF
- **M** – molska masa
- **f** – faktor redčitve

1 UVOD

1.1 ČESEN (*Allium sativum*)

1.1.1 ZGODOVINA ČESNA

V času, ko farmacevtska industrija in antibiotiki še niso bili odkriti, je imel česen v zdravstvu velik pomen zaradi svojih zdravilnih učinkov. Nekatera prepričanja o česnovih zdravilnih učinkih so se ohranila celo do danes, tako kot tudi nekatera njegova poimenovanja, na primer ruski penicilin, naravni antibiotik, rastlinski talisman, kačja trava in podobno (Petrovska & Cekovska, 2010). Ob pojavu epidemij, na primer kolere in gripe, je bil česen v preteklosti uporabljen kot preventiva in eno izmed najpomembnejših zdravil (Petrovska & Cekovska, 2010). Česen je stara kulturna rastlina, ki izhaja iz osrednje Azije. Skupaj s čebulo so ga začeli načrtno gojiti v Egiptu, kjer je postal pomembna sestavina v prehrani. Česen je tam veljal za božji dar, zato ga niso smeli uživati svečeniki. Česen se je razširil na sever in zahod. Tudi Grki, Rimljani, Germani in Galci so ga kot prejšnje kulture uporabljali v več namenov, torej kot začimbo, hrano in zdravilo. O česnu so v zgodovini tudi večkrat pisali, npr. nekateri grški zdravniki in srednjeveški avtorji knjig o zeliščih (A. Vogel, 2024). Grški zdravnik Hipokrat ga je predpisoval proti zaprtju, kopičenju vode v organizmu, gobavosti, vnetju, pri težavah s prebavo in raku. Med prvo svetovno vojno so ga ruski vojaki uporabljali za celjenje ran, od tam tudi ime ruski penicilin. Danes je česen razširjen predvsem po Evropi, Aziji in Južni Ameriki (Kočevar, 2024).

1.1.2 OPIS

Česen (znanstveno *Allium sativum* L.) skupaj s čebulo, šalotko, zimskim lukom in drobnjakom uvrščamo v skupino čebulnic in družino lukovk (*Alliaceae*) (Valič, 2016). Česen delimo na dve podvrsti, in sicer *Allium sativum* sp. *ophioscorodon*, ki tvori cvetna stebela – ima trd vrat, in *Allium sativum* sp. *sativum*, ki ima mehak vrat. (Vrt Obilja, brez datuma). Uspeva v zmernem in toplem podnebjju, posebno na lažjih, strukturnih tleh z blago kislostjo. Značilno za hranjenje česna je, da ga s posušenimi listi, povezanimi v kite, obesimo v zračen, senčen prostor, lahko pa ga vložimo (Mlinar, 2019).

1.1.3 ZNANSTVENA KLASIFIKACIJA

Tabela 1: znanstvena klasifikacija česna (*Bionity, brez datuma*)

DOMENA	evkarionti (Eukarya)
KRALJESTVO	rastline (Plantae)
DEBLO	kritosemenke (Magnoliophyta)
RAZRED	enokaličnice (Liliopsida)
RED	Asparagales
DRUŽINA	čebulnice (Alliaceae)
ROD	<i>Allium</i>
VRSTA	<i>Allium Sativum</i>

1.1.4 OPIS RASTLINE

Podolgovata glavna čebulica in stroki oziroma stranske čebulice, ki so drug ob drugem razvrščeni okrog glavne čebulice, tvorijo glavico česna. Vsak strok je obdan z belo kožnato lupino. Na spodnji strani glavice se nahajajo korenine. Iz glavne čebulice zraste 30–80 cm visoko steblo, ki nosi zelene liste, na konici pa cvetni kobul. Na eni strani obdaja cvetni kobul dolg, ošiljen ovršni list (Živko, 2024).



Slika 1: rastlina česen

1.1.5 SESTAVA

Česen je sestavljen iz mnogih žveplo vsebujočih snovi, ki jih delimo na hlapne in nehlapne substance. Med hlapne substance sodijo sekundarni produkti aliina, ki jih delimo na produkte, ki so nastali po encimski poti (alicin, alil propil disulfid, dialil disulfid dialil trisulfid), in produkte, ki so nastali po neencimski poti (*S*-alilmerkaptocistein, *S*-metilmerkaptocistein). Nehlapne substance v česnu pa so *S*-alk(en)il cistein sulfoksidi (aliin, metiin, propiin), -glutamil peptidi, *S*-substituirani cisteini in cikloaliin. Česen poleg žveplovih snovi vsebuje tudi surove beljakovine, ogljikove hidrate, malo vode, zelo malo surovih maščob, metil-alil-disulfid in alil-sulfid. Vsebuje tudi antibiotično delujoči alicin, ki nastane iz aliina. V česnu so prisotni vitamini A, B in C ter minerali (kalij, kalcij, jod, fosfor, selen, železo) (Valič, 2016).

1.1.5.1 OGLJIKOVI HIDRATI

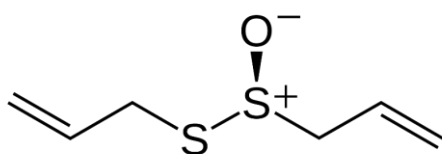
Ogljikovi hidrati so organske kisikove spojine. V njihovih molekulah sta poleg ogljika tudi vodik in kisik, ki sta vezana v razmerju 2 : 1. Ogljikove hidrate pogosto imenujemo sladkorji ali saharidi. Delimo jih na monosaharide, ki so preprosti ogljikovi hidrati, oligosaharide in polisaharide, ki so sestavljeni iz več enot monosaharidov. Ogljikovi hidrati nastajajo pri fotosintezi rastlin. Monosaharidi so preprosti ogljikovi hidrati. Delimo jih na funkcionalno skupino (aldoze in ketoze) oziroma glede na število ogljikovih atomov (pentoze, heksoze, itd.). Molekule monosaharidov se lahko nahajajo v aciklični ali ciklični obliki. Ciklični obliki sta piranoza (šestčlenski obroč) in furanoza (petčlenski obroč). V molekulah monosaharidov so centri kiralnosti. Monosaharid se lahko nahaja v L- in D-konfiguraciji, ki sta enantiomera. Oznaki α - in β - označujeta konfiguracijo hidroksilne skupine na anomernem ogljikovem atomu v ciklični obliki monosaharida. Disaharidi so spojine, v katerih sta dve monosaharidni enoti povezani preko glikozidne vezi. Med disaharide uvrščamo saharozo, laktozo in maltozo. Celuloza, škrob in glikogen so polisaharidi, sestavljeni iz velikega števila enot D-glukoze. Enote D-glukoze so vezane na različne načine, zato imajo tudi polisaharidi različne lastnosti. Škrob in celuloza se nahajata v rastlinah (Smrdu, 2008).

1.1.5.2 BELJAKOVINE

V beljakovinah je s peptidnimi vezmi vezano večje število aminokislin. Beljakovine se razlikujejo v številu, vrsti in zaporedju vezanih aminokislin. Glede na sestavo jih delimo na enostavne beljakovine in sestavljene beljakovine. Beljakovine lahko delimo tudi po obliki na nitaste (fibrilarne) in kroglaste (globularne). Enostavne beljakovine ali proteini so zgrajene le iz aminokislinskih enot (peptidne verige). Takšne beljakovine so npr. kolageni. Sestavljene beljakovine (konjugirane beljakovine) poleg peptidne verige vsebujejo tudi nebeljakovinski del. Takšni beljakovini sta npr. hemoglobin in kazein. Beljakovine so občutljive na različne vplive, ki porušijo njihovo strukturo. S tem se uniči njihova biološka aktivnost, ki ji rečemo tudi denaturacija. Zgradbo beljakovin opisujemo na štirih nivojih (strukturah). Primarna struktura opisuje sekvenco aminokislin v peptidni verigi. Sekundarna struktura opisuje zvijanje posameznih delov peptidne verige. Terciarna struktura opisuje prostorsko ureditev peptidne verige, kvartarna struktura pa povezovanje dveh ali več peptidnih verig v funkcionalno beljakovino (Smrdu, 2008).

1.1.5.3 ALICIN

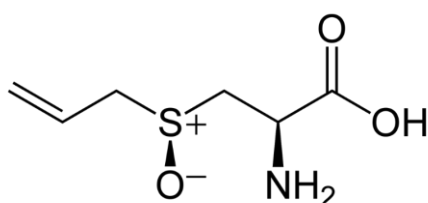
Alicin (dialil-tiosulfinat ali dialil-disulfid-oksid, $C_6H_{10}OS_2$) je obrambna organska žveplova spojina, ki jo lahko najdemo v česnu (*Allium sativum* L.) in pri nekaterih vrstah čebule kot je rdeča čebula (*Allium cepa* L.). Alicin nastane ob poškodbi tkiva, ko encim aliinaza preoblikuje aminokislino aliin (S-alil-cistein-sulfoksid). Alicin velja za najpomembnejšo sestavino česna, ki se uporablja v medicinske namene že od antičnih časov. Česnu pa daje tudi značilen vonj in okus. Kot tiosulfinat spada alicin v reaktivno skupino z žveplovimi spojinami (RSS) in v redoks reakcijo vstopa s tiolnimi skupinami v glutationu ter proteini, ki so bistvenega pomena za njegovo biološko aktivnost. V nekaterih virih navajajo, da naj bi imel blagodejne učinke na zdravje ljudi. Posebno pozornost pri raziskovanju pa nekateri znanstveniki posvečajo tudi njegovemu morebitnemu protirakavemu, antidiabetičnemu, imunomodulatornemu in antikoksidativnemu učinku. (Bartulović, Turković Feher, & Ćuić Mojsović, 2022).



Slika 2: skeletna formula alicina

1.1.5.4 ALIIN

S-alil-cistein-sulfoksid ali aliin je glavna aktivna sestavina česna. (Fabián, Sahagún, Carrera, & Roa, 2013) Aliin je derivat aminokisljine cisteina, ki ga encim aliinaza med žvečenjem, sekljanjem, rezanjem in podobno preoblikuje v alicin. (JOVCHEVSKA, 2022) Deluje nevro- in kardioprotektivno ter je močan antioksidant. Pomaga zmanjšati raven trigliceridov, sečne kisline, glukoze in inzulina v krvi, tako kot tudi zmanjša inzulinsko rezistenco in raven citokinov. (Fabián, Sahagún, Carrera, & Roa, 2013) Aliin se nahaja v mezofilnih celicah, medtem ko se aliinaza nahaja v celicah ovojnih snopov (Charron, Milner, & Novotny, 2016).



Slika 3: skeletna formula aliina

1.1.5.5 VITAMIN A

Vitamin A je pomemben za pravilno delovanje našega organizma, zato moramo z uravnoteženo prehrano ohranjati zadostne nivoje vitamina A v našem telesu. Vitamin A je prisoten v živilih živalskega izvora, in sicer v obliki retinola, vendar je le-ta v prosti obliki kemijsko nestabilen, zato se vitamin A v živilih nahaja tudi v obliki retinil palmitata. Bogati viri vitamina A so ledvice, jetra, mastne ribe, polnomastni mlečni izdelki in obogatene margarine. V rastlinskih živilih se vitamin A nahaja v obliki provitaminov A, to so beta karoten in ostali karotenoidi. Vendar pa sta absorpcija in izkoristek beta karotena (oziroma njegova pretvorba v vitamin A) zelo odvisna od posameznikovih razlik v absorpciji maščob in precej nihata. Karotenoidi so antioksidanti, ki se kopičijo v krvni plazmi in maščobnem tkivu ter zmanjšujejo tveganje za nastanek določenih vrst raka. Dober vir karotenov sta rumeno, oranžno in rdeče obarvana sadje in zelenjava ter zelena zelenjava, na primer paradižnik, ohrovt, solata, brokoli, špinača, paprika, stročji fižol. Ob prevelikem vnosu je vitamin A strupen, zato moramo biti pazljivi pri jemanju prehranskih dopolnil z vitaminom A. Vitamin A ima pomembno vlogo pri zagotavljanju dobrega imunskega sistema in vida ter razvoju celic in tkiv. Ima vlogo pri presnovi železa, ohranjanju vida, delovanju imunskega sistema, specializaciji celic ter prispeva k

ohranjanju zdrave kože in zdravih sluznic (Korošec, brez datuma). Domneva se, da ima več kot 254 milijonov ljudi pomanjkanje retinola v krvi, in sicer 69 % ljudi iz jugovzhodne Azije, 49 % ljudi v Afriki in eden od štirih oziroma petih v ostalih regijah. Pomanjkanje vitamina A ostaja glavni razlog za otroško slepoto v nerazvitih državah. Brez zdravljenja tako dve tretjini otrok umreeta v nekaj mesecih od okužbe zaradi povečane tveganosti za ostale nalezljive bolezni. Pomanjkanje vitamina A je tako povezano tudi s povečano umrljivostjo otrok v vsaj 122 državah Afrike, južne in jugovzhodne Azije in nekaterih delih Latinske Amerike. Nizek nivo retinola v krvi in nočna slepota sta pogosta tudi pri nosečnicah (Combs Jr. & McClung, 2016).

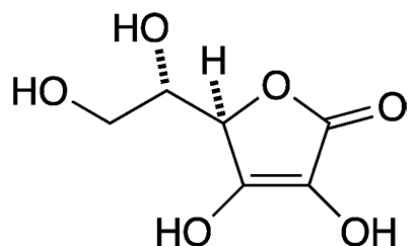
1.1.5.6 VITAMIN B

B-kompleks sestavlja 8 vitaminov, in sicer B1 (tiamin), ki ima ključno vlogo pri nekaterih presnovnih reakcijah (npr. za nastanek adenozin trifosfata-ATP), B2 (riboflavin), ki je pomembnem za tvorbo eritrocitov, B3 (niacin), ki pomaga uravnavati živčni in prebavni sistem ter pretvoriti hrano v energijo, B5 (pantotenska kislina), ki razgrajuje ogljikove hidrate in maščobe in je pomemben za proizvodnjo hormonov, B6 (piridoksin), ki pomaga pri sintezi živčnih prenašalcev in pri sintezi hormonov serotonina in noradrenalina, B7 (biotin), ki je vključen v proizvodnji hormonov, B9 (folna kislina), ki je pomemben pri razvoju celic, sintezi DNK in spodbujanju rasti eritrocitov ter zmanjšuje tveganje za okvare ploda, in B12 (kobalamin), ki pomaga uravnavati živčni sistem ter ima vlogo pri nastanku eritrocitov. Dnevno zaužijemo zadostne količine vitamina B z uravnoteženo prehrano, bogato z oreščki, žitaricami, stročnicami, listnato zelenjavo, jajci in pustim mesom (Podjetje Galex d.d., 2024).

1.1.5.7 VITAMIN C

Vitamin C lahko z drugim imenom poimenujemo tudi *L*-askorbinska kislina in je ketolakton s šestimi ogljikovimi atomi. Je nasičen ciklični ester hidrokarboksilne kisline in vsebuje dve hidroksilni skupini, ki imata močne redukativne lastnosti. Netopen je v kloroformu in etru, dobro pa je topen v vodi in alkoholu. Vitamin C je tudi skupno ime za vse spojine, ki kvantitativno kažejo biološko aktivnost *L*-askorbinske kisline. Vloga tega nutrienta v našem telesu je, da ščiti celice imunskega sistema v obrambi pred prostimi radikali, kar je ključno pri nahodu, gripi, drugih obolenjih in okužbah ter po operacijah. Direktno ali posredno sodeluje pri krepitvi imunskega sistema, saj makrofagom in

nevtrofilcem pomaga uničiti in poiskati viruse, krepi delovanje celic in pomaga pri tvorbi protiteles v telesu (Stušek, 2013).



Slika 4: skeletna formula vitamina C

1.1.6 UPORABA

Česen se svež ali kot začimba uporablja v vsakdanji prehrani za popestritev okusa. Mnogi ga uživajo kot naravni antibiotik, saj ima poleg svojega značilnega okusa in vonja še mnoge druge zdravilne učinke.

1.1.6.1 UPORABA V HRANI

Ko je surov, ima česen oster, pikanten okus, medtem ko nas kuhan lahko spominja na oreščke. Česnov okus po gorčici pa prispevajo žveplove spojine. Posušen in zdrobljen česen izgubi svoj ostri okus in je tako zelo priljubljena začimba, ki se poda k skoraj vsaki hrani. Svoj močni okus in aromo spremeni glede na različne metode kuhanja, najpogosteje pa je prepražen skupaj s čebulo. Lahko ga pražimo do mehkega in sladkega ter ga uporabimo kot namaz, vlijemo v olja, naredimo česnovo maslo, uporabimo kot začimbo ali v solatnih prelivih. Skratka, praženje česna omehča njegov močni, pikantni okus. Česen pa je v kulinariki uporabljen tudi na drugačne načine, na primer v Koreji je popularen postopek staranja česna pri visokih temperaturah, katerega produkt je črni česen, ki ima slajši okus. Na Kitajskem je priljubljena zelenjava česnov drobnjak, ki se uporablja v rezancih, cmokih in umešanih jajcih (MasterClass, 2022).

1.1.6.2 UPORABA V ZDRAVSTVENE NAMENE IN ZDRAVILNI UČINKI

Česen je bogat vir številnih fitonutrientov, ki so pomemben element t. i. mediteranske diete. V eni od raziskav so z razpoložljivimi dokazi pokazali, da lahko česen zniža krvni tlak pri hipertenzivnih bolnikih in bolnikih z dvignjenim sistoličnim krvnim tlakom, vendar ne pri normotenzivnih osebah. Med drugim so bili tudi dokazi o učinkih česna na lipidne parametre sporni, zato avtorji raziskave ne morejo sprejeti odločitve, ali je česen dovolj učinkovit pri zmanjševanju skupnega holesterola, lipoproteina visoke gostote in

trigliceridov. Omenjeni so bili tudi pozitivni učinki glede uživanja česna in zmanjšanja tveganja za vse vrste raka in antiglikemičnih učinkov. Podobno velja za učinke česna pri srčno-žilnih boleznih in smrtnostjo, vendar je treba dodati, da so trditve avtorjev pri tem tudi nasprotne (Bayan, Hossain Koulivand, & Gorji, 2014). Znanstveniki sklepajo, da bi česen lahko bil učinkovit na nekaterih področjih klinične prakse, zato bi morale biti nadaljnje raziskave dobro načrtovane, da se izognejo morebitni pristranskosti (Li, in drugi, 2013).

1.1.7 NEŽELENI UČINKI

Ob uporabi česna se lahko pojavijo stranski učinki, npr. goreč občutek v ustih in želodcu, bruhanje in diareja. Pri občutljivejših lahko sproži tudi alergije ali celo migrene. Lahko moti tudi zdravljenje z antikoagulansi in ostalimi zdravili proti strjevanju krvi s hipoglikemiki ter poveča delovanje nenasičenih maščobnih kislin ω -3. Zaradi česnovih stranskih učinkov mnogi priporočajo njegovo uživanje v različnih oblikah oziroma pripravkih (Kočevar, 2024).

1.2 ČRNI ČESEN

1.2.1 ZGODOVINA

Izvor črnega česna ni natančno znan, a domneva se, da so ga najprej uživali v Koreji, na Japonskem in Tajskem (Ahmed & Wang, 2021). Vzhodni Tajvan in druge države so ga uvedli pred približno 10 leti. V zadnjih nekaj letih je črni česen pritegnil številne vrhunske kuharje, ki ga pogosto uporabljajo za aromatiziranje piščanca, rib, juhe in rižote. V primerjavi s svežim česnom ne sprošča neprijetnega okusa in vonja zaradi zmanjšane vsebnosti alicina, ki se med procesom staranja pretvori v antioksidativne spojine (Cheng, in drugi, 2017).



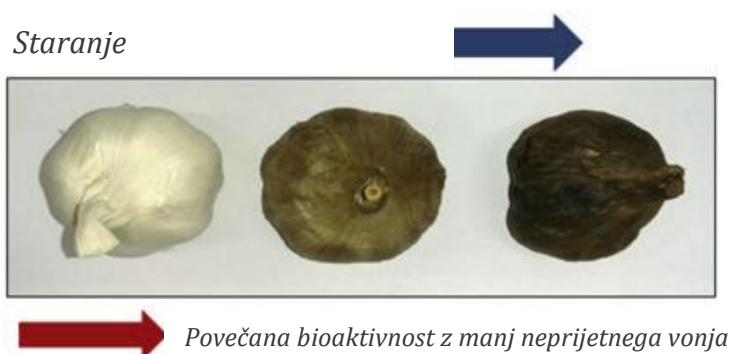
Slika 5: črni česen

1.2.2 OPIS

Črni česen je produkt, ki nastane s staranjem svežega česna (*Allium sativum*) pri visokih temperaturah in vlažnosti. Med celotnim procesom dobi česen temno barvo (skoraj črno), sladek okus, postane žvečljiv ter zaradi zmanjšane vsebnosti alicina ne oddaja več značilnega močnega vonja. Tudi ime je dobil po svoji črni barvi. Razlike v temperaturi, času, vlažnosti in načinu pridelave morebiti spremenijo strukturo in sestavo česna. Črni česen je skozi leta postal množično uporaben na različnih področjih, na primer v kulinariki zaradi svojega posebnega okusa in kot prehransko dopolnilo zaradi domnevnega doprinosa k zdravju (Cheng, in drugi, 2017).

1.2.3 PROCES NASTANKA

Črni česen dobimo iz svežega česna, in sicer zaradi procesov, ki potečejo v slednjem, ko ga za določen čas pustimo pod nadzorovano temperaturo in vlažnostjo (Ahmed & Wang, 2021). Med toplotno obdelavo nastaja melanoidin, ki da česnu značilno črno barvo (Kang, 2016). Postopki predelave se razlikujejo glede na regionalne tradicije in lastnosti, ki jih želimo od končnega izdelka. Raziskovalci še vedno poskušajo najti optimalne pogoje za predelavo svežega česna v črnega, najpogosteje pa je to opravljeno pri temperaturah 30–90 °C, relativni vlažnosti 50–90 % in inkubacijski dobi 10–80 dni. Postopki, izvedeni pred toplotno obdelavo svežega česna, se imenujejo predhodne obdelave in vplivajo na lastnosti končnih izdelkov. Nekatere predhodne obdelave česna lahko poškodujejo ali uničijo njegovo celično strukturo, kar sproži takojšnje reakcije med celičnimi komponentami in zunanjimi elementi. Temperatura in relativna vlažnost med proizvodnjo sta kritični spremenljivki, ki vplivata na kakovost črnega česna (Ahmed & Wang, 2021).



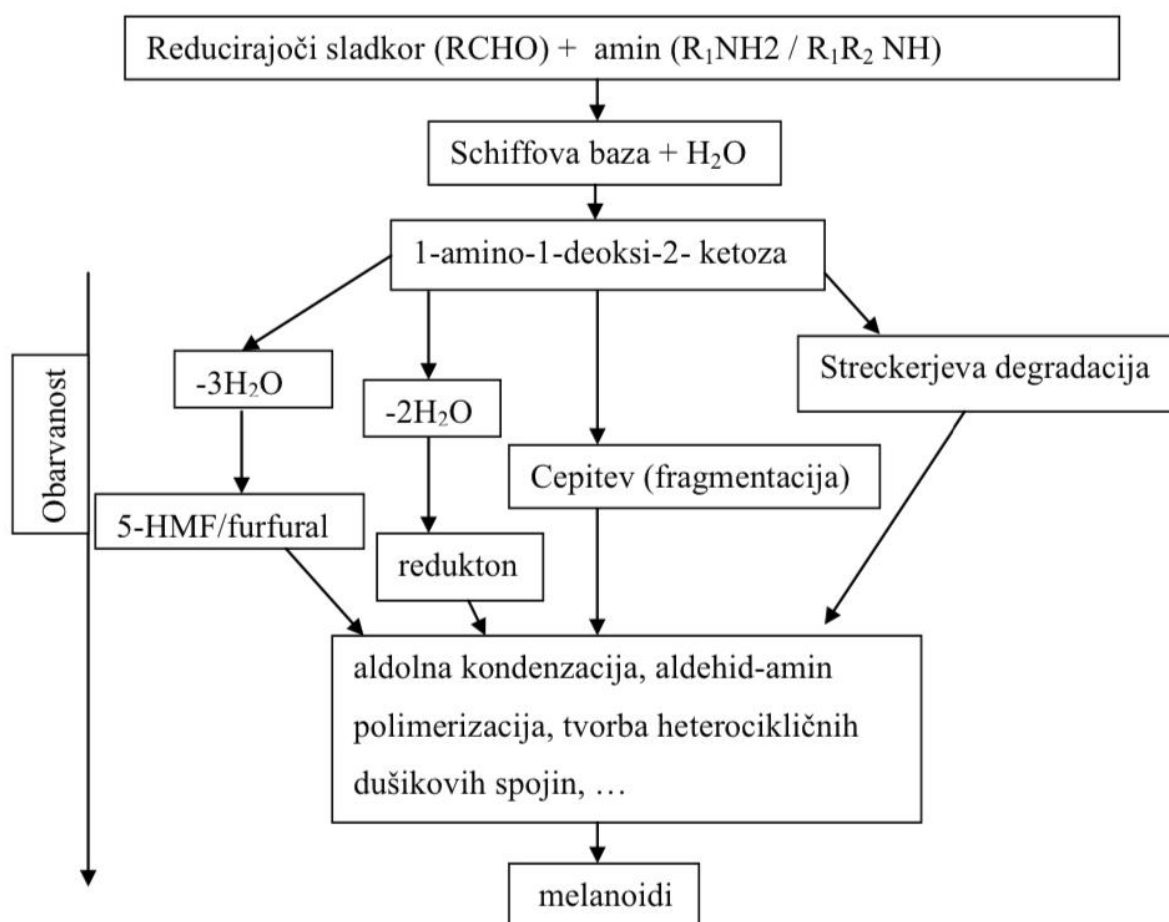
Slika 6: videz česna pri staranju

1.2.3.1 KARAMELIZACIJA

Karamelizacija je proces mnogih kemičnih reakcij, pri katerih ni pristotnih amino skupin. Gre za reakcije, ki potečejo ob izpostavljanju ogljikovih hidratov visokim temperaturam. Na proces vplivajo različni dejavniki, kot so pH, soli in koncentracija saharoze. Slednja s procesom hidrolize razpade na glukozo in fruktozo. Nadaljnja razgradnja teh produktov pa je odgovorna za nastanek še več produktov, eden izmed njih je tudi 5-hidroksimetilfurfural oziroma HMF. Reakcija karamelizacije snovi spremeni tudi bravo, in sicer snov porjavi. Rjavo barvo pripisujejo proizvodnji polimerov med potekom reakcije (Quintas, Brandão, & Silva, 2007).

1.2.3.2 MAILLARDOVA REAKCIJA

Maillardova reakcija se imenuje po francoskem kemiku Louisu-Camillu Maillardu, ki je preučeval termično obdelovanje hrane in leta 1913 odkril, da pri temperaturi nad 100 °C pride do povezave beljakovin in sladkorja v novo molekulo. Pri tem nastanejo nove arome, okusi in snovi. Optimalni pogoji za potek Maillardove reakcije so med 110 in 170 °C, saj se pri višjih temperaturah začnejo tvoriti kancerogene snovi (Gurman.eu, 2015). Maillardova reakcija poteka med sušenjem vseh vrst živil. Gre za kemijsko reakcijo neencimskega porjavenja. Odgovorna je za nastanek mnogih spojin prijetnega okusa in vonja ter za nastanek arome pri pečenih in praženih živilih. Poteče med spojinami z amino skupino, kot so aminokisliline in proteini, ter karbonilno skupino, ki je recimo značilna za sladkorje. Najpomembnejši produkti Maillardove reakcije so cikloten, furaneol ter maltol, ki imajo vonj po karameli, in alkilpirazini, ki imajo vonj po dimu oziroma pečenem (Kastelic Švab, 2016).



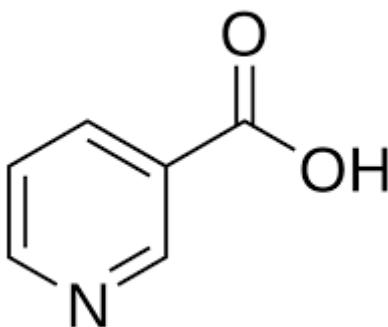
Slika 7: shema Maillardove reakcije

1.2.4 SESTAVA

Črni česen je sestavljen iz mnogih kemijskih spojin. Med spojinami prevladujejo *S*-alil-*L*-cistein, *S*-alilmerkaptcistein, *S*-metil-*L*-cistein, fruktozil-*S*-alilcistein, γ -glutamil-*S*-alilcistein, fruktozil- γ -glutamil-*S*-alilcistein, fruktozil-arginin, fruktozil-fenilalinin, fruktozil- γ -glutamil-*S*-1-propilcistein, dialil sulfid, dialil disulfid, dialil trisulfid, 5-hidroksimetil furfural, flavanoli, 1-metil-1,2,3,4-tetrahidro- β -karbonil-3-karboksilna kislina, 1-metil-1,2,3,4-tetrahidro- β -karbonil-3-dikarboksilna kislina, glukoza, fruktoza, piruvična kislina, *p*-kumarinska kislina, *o*-kumarinska kislina, *m*-kumarinska kislina, melanoidi, dve vrsti saponinov, triptofan, histidin, valin, glicin, arginin in asparaginska kislina. Vsebuje še manjše vrednosti mineralov, lipidov, ogljikovih hidratov, proteinov in vitaminov, še sploh vitamina C, B3, B6 (Ahmed & Wang, 2021).

1.2.4.1 VITAMIN B3

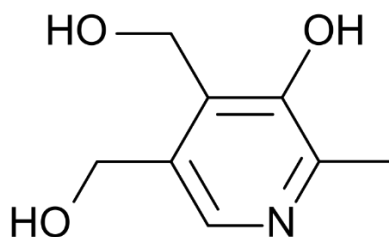
Vitamin B3 ali niacin se pojavlja v obliki nikotinamida in nikotinske kisline. Vitamin B3 skupaj z vitaminom B2 sestavlja številne encime, ki sodelujejo pri pretvarjanju energije iz hranilnih snovi. Ima pomembno vlogo pri delovanju prebavil in živčevja, znotraj posameznih celic skrbi za popravila poškodovane dedne informacije in sodeluje pri nastajanju novih celic. Pomanjkanje vitamina B3 lahko povzroči pelagro, ki se povečini pojavlja med revnejšimi prebivalci, saj njihova prehrana temelji na uživanju prosa in koruze. Bolezenski znaki pelagre so diareja, dermatitis in demenca. Med razvitim prebivalstvom lahko pride do pomanjkanja vitamina B3 zaradi pretiranega uživanja alkohola in motenj v presnovi (Gojkošek, 2012).



Slika 8: skeletna formula vitamina B3

1.2.4.2 VITAMIN B6

Vitamin B6 ali piridoksin sestavljajo tri skupine biološko enakovrednih aktivnih oblik; te so piridoksal, piridoksamin in že omenjeni piridoksin. Omenjene tri oblike vitamina se metabolizirajo do skupnega koencima, ki se imenuje piridoksal fosfat. Ta ima bistveno vlogo pri metabolizmu, vpliva pa na rast, utrujenost, aktivnost steroidnih hormonov, kognitivni razvoj, na živčni in imunski sistem. Blažja oblika pomanjkanja povzroča težave s črevesjem in kožo, zmanjšano odpornost proti različnim vnetjem, boleče ustne koticke, utrujenost in potrtost. V primeru dolgotrajnega pomanjkanja vitamina B6 se pojavijo težave v metabolizmu magnezija, fosforja in kalcija, kar vodi do pomanjkanja železa. Pomanjkanje vitamina B6 se značilno hitreje pojavi pri ženskah, ki jemljejo kontracepcijske tablete, in pri nosečnicah (Gojkošek, 2012).



Slika 9: skeletna formula vitamina B6

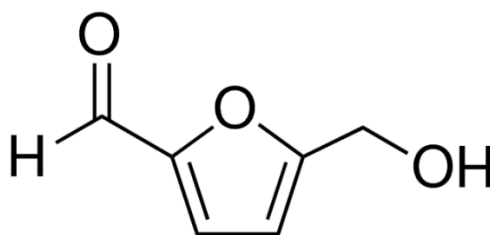
1.2.5 PRIMERJAVA S SVEŽIM ČESNOM

Svež česen vsebuje okoli 63 % vode, 28 % ogljikovih hidratov (fruktani), 2,3 % organskih žveplovih spojin, 2 % beljakovin (aliinaze), 1,2 % prostih aminokislin (arginin) in 1,5 % vlaknin. Neobdelan svež česen vsebuje tudi visoko količino γ -glutamilsteinov. Te spojine se lahko hidrolizirajo in oksidirajo, da nastane aliin, ki se naravno kopiči med shranjevanjem česna pri hladni temperaturi. Po predelavi, kot so rezanje, drobljenje, žvečenje ali dehidracija, aliinaza hitro razgradi citotoksične cisteinsulfokside (aliin), da nastane citotoksični in dišeči alkilalkan-tiosulfinat, kot je alicin. Alicin in drugi tiosulfinati se takoj razgradijo na druge spojine, kot so dialil sulfid, dialil disulfid in dialiltrisulfid. Hkrati se γ -glutamilsteini pretvorijo v *S*-alil-*L*-cistein, ki prispeva k zdravstvenim koristim česna. Črni česen vsebuje veliko več funkcionalnih spojin (kot so *S*-alil-*L*-cistein) kot sveži česen. Vsebnost kemičnih spojin črnega česna je odvisna od pogojev med termično obdelavo. Črni česen vsebuje več spojin, npr. polifenolov, flavonoidov, melanoidinov, 5-HMF (5-hidroksimetilfufural), in nekaterih antioksidantov kot sveži česen. Sicer pa se med termično obdelavo zmanjša vsebnost alicina, ki je ena vodilnih spojin svežega česna (Cheng, in drugi, 2017).



Slika 10: sveži in črni česen

1.2.5.1 5-HIDROKSIMETILFURFURAL



Slika 11: skeletna formula 5-hidroksimetilfurfurala

5-hidroksimetilfurfural (5-HMF) je organska spojina, ki nastane pri Maillardovi reakciji, in sicer ob segrevanju reducirajočih sladkorjev v kislem okolju. Spojina je zanimiva, saj ima tako škodljive kot koristne učinke na zdravje. Pogosto jo najdemo v toplotno obdelanih živilih (Shapla, Solyman, Alam, Khalil, & Gan, 2018).

5-HMF nastane kot posledica razgradnje sladkorja pri Maillardovi reakciji, ki se pojavi med predelavo hrane. Tako je spojina prisotna v številnih toplotno obdelanih prehranskih izdelkih, ki vsebujejo sladkor, na primer v kosmičih, kruhu, mlečnih izdelkih, sadnih sokovih ... Razlikuje pa se koncentracija vsebnosti HMF v živilih (Shapla, Solyman, Alam, Khalil, & Gan, 2018).

HMF je heterociklična organska spojina z aldehydnimi in alkoholnimi funkcionalnimi skupinami. V naravi obstaja kot trdna rumena snov z nizkim tališčem in visoko topnostjo v vodi (Shapla, Solyman, Alam, Khalil, & Gan, 2018).

5-HMF je že dolgo povezan z negativnimi učinki na zdravje, vključno s citotoksičnostjo za sluznico, kožo in zgornje dihalne poti ter mutagenostjo in potencialno rakotvornostjo pri ljudeh in živalih (Glatt, Schneider, & Liu, 2005), (Lee, Shlyankevich, Jeong, Douglas, & Surh, 1995), (Monien, Engst, Barknowitz, Seidel, & Glatt, 2012). Nedavne študije pa so pokazale številne pozitivne učinke HMF. Ti vključujejo antioksidativne lastnosti (Zhao, in drugi, 2013), protialergijske učinke (Yamada, Nemoto, Shigemori, Yokota, & Isoda, 2011), protivnetne učinke (Kitts, Chen, & Jing, 2012), antihipoksične lastnosti (Li, in drugi, 2011) in antihiperurikemijske učinke (Lin, in drugi, 2012), (Shapla, Solyman, Alam, Khalil, & Gan, 2018).

Določitev varnih ravni uživanja HMF je zahtevna, saj je hitrost izločanja HMF iz telesa odvisna od posameznika in od delovanja posameznega organa, najbrž pa ljudje na dan zaužijemo od 30 do 150 mg HMF (Shapla, Solyman, Alam, Khalil, & Gan, 2018).

1.2.5.2 MELANOIDINI

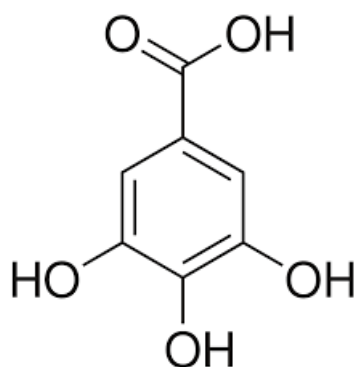
Melanoidini so kompleksne rjave spojine, ki so produkt Maillardove reakcije, ki poteče pri toplotni obdelavi hrane. Hrani dajejo značilen vonj, okus in barvo. Imajo antioksidativne lastnosti in koristne učinke na zdravje (Wu, Yan, & Zhang, 2021).

1.2.5.3 POLIFENOLI

Polifenoli so najštevilčnejša in najbolj razširjena skupina bioaktivnih molekul. Delijo se v dve skupini, in sicer flavonoide in fenolne kisline. Flavonoidi se dalje delijo še na flavone, flavonone, flavonole, flavanole in izoflavone, medtem ko se fenolne kisline delijo na hidroksibenzojske in hidroksicimetove kisline. Polifenoli igrajo vlogo pri preprečevanju številnih bolezni, na primer pri hiperglikemiji, povečanem holesterolu, hiperlipidemiji in pri razvoju raka. Pravijo jim tudi fitokemikalije, saj pomagajo ščititi pred kronično degenerativnimi boleznimi. Polifenoli imajo v jedru fenolni obroč, ki je osnova za njihovo razvrstitev v fenolne kisline in fenolne alkohole. Glede na moč fenolnega obroča jih lahko še nadalje kategoriziramo. Polifenoli so eni izmed najbolj razširjenih antioksidantov v naši prehrani. Z njimi so bogata živila rastlinskega izvora, nahajajo se torej v sadju, zelenjavi in žitaricah (Abbas, in drugi, 2017).

1.2.5.4 GALNA KISLINA

Galna kislina je derivat benzojske kisline in enostavna fenolna kislina z enim aromatskim obročem. Njeno ime po IUPAC nomenklaturi je 3,4,5-trihidroksibenzojska kislina. V velikih količinah jo najdemo v čaju, grozdju, rastlinskih semenih in nekaterih zelenih algah. Gre za rumenkasto beli kristal z vreliščem 250 °C. Znana je po vplivu na več farmakoloških in biokemičnih poti, ima močne antioksidativne, protivnetne, antimutagene ter protirakave lastnosti (Verma, Singh, & Mishra, 2013) in gre tako za bioaktivno molekulo.



Slika 12: skeletna formula galne kisline

1.2.6 UPORABA

1.2.6.1 UPORABA V HRANI

Črni česen je odkrila tudi visoka kulinarika in se v njej množično uporablja. Slovi kot eno od superživil. V Sloveniji je še dokaj nepoznan, vendar je v butičnih izdelkih od leta 2015 na voljo na ljubljanski tržnici. Zadnja leta je priljubljena sestavina. Pravijo mu tudi peti okus in ga uporabljajo tudi v restavracijah, ki imajo Michelinove zvezdice. Aroma črnega česna se dobro poda tako k mesu kot sladicam. Mojstri visoke kuhinje pa se strinjajo, da najbolj obogati omake (Delo, 2016).

1.2.6.2 UPORABA V ZDRAVSTVENE NAMENE IN ZDRAVILNI UČINKI

Črni česen naj bi v teoriji imel več zdravilnih učinkov, pozitiven vpliv naj bi imel proti rakavemu delovanju (Wang, in drugi, 2012), na prekomerno telesno maso (Sunkara & Verghese, 2014), proti vnetjem (Sunkara & Verghese, 2014), na jetra (Tran, Pham, & Trinh, 2019) in pa naj bi imel nevroprotektivne učinke (Tran, Pham, & Trinh, 2019). Kljub temu, pa zaradi procesa nastanka, črni česen izgubi prvotne vsebnosti alicina, ki ga povezujejo s terapevtskimi učinki. Številne študije so dokazale kardioprotektivne učinke črnega česna, vendar so ti omejeni. Obstaja pa nekaj obetavnih raziskav, ki kažejo, da ima lahko črni česen koristne učinke na srce med ishemijo in reperfuzijo. Tu spet priporočajo nadaljnje raziskave, ki bodo ključne za razumevanje celotnega spektra terapevtskih učinkov črnega česna na srčno-žilni sistem (Ryu & Kang, 2017).

1.3 METODE DELA

1.3.1 EKSTRAKCIJA

Ekstrakcija je kemijska metoda, pri kateri gre za ločevanje aktivnih delov rastline z uporabo topil po standardnih postopkih. Za ekstrakcijo je pomembna primerna izbira topil, ki omogočajo ekstrakcije poljubnih analitov. Ekstrakcija ima nekaj pomanjkljivosti, npr. težave pri avtomatizaciji, je časovno zahteven proces in uporaba organskih topil (te spremljata toksičnost in cena). Poznamo več vrst ekstrakcij. Prva je ekstrakcija iz plinske faze, ki poteka tako, da plinsko fazo uvajamo v topilo. Topni analiti se v tekoči fazi zadržijo. Druga vrsta so ekstrakcije tekočih vzorcev (liquid-liquid – LLE). Za to je potreben pogoj, da imata topila različne polarnosti. Analit se porazdeli med dve fazi, porazdelitveno ravnotežje je odvisno od lastnosti topil in temperature. Za ekstrakcije iz trdnih delcev uporabljamo več vrste ekstrakcij, npr. ekstrakcijo po Soxletu (konvencionalna ali avtomatizirana), ultrazvočno ekstrakcija, ekstrakcijo z mikrovalovi, ekstrakcijo pri

povišanem tlaku ali pospešeno ekstrakcijo in superkrično ekstrakcijo (Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2013). Namen ekstrakcij je ločiti topne rastlinske metabolite od netopnih celičnih tropin. Snov se pri ekstrakciji kemično ne spremeni. Nekateri ekstrakti so uporabni že po prvem ekstrahiranju, ostali pa potrebujejo nadaljnjo obdelavo (Azwanida, 2015).

1.3.1.1 ULTRAZVOČNA EKSTRAKCIJA

Ultrazvočna ekstrakcija (UAE) deluje po principu, da interakcija ultrazvočnih valov z raztopino povzroča intenzivno mešanje in interakcijo med topilom in analiti. Prednosti te ekstrakcije so hitrost (od pol ure do ene ure), uporabimo lahko večje mase analita in ekstrakcija je neodvisna od analize osnove. Metoda ima tudi nekaj pomanjkljivosti, te so: poraba topil, potrebno je čiščenje ekstraktov, po ekstrakciji je pogosto potrebno filtriranje in odparevanje topila. Za metodo se uporabljajo ultrazvočne kopeli in ultrazvočne sonde (Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2013).

1.3.2 CENTRIFUGIRANJE

Centrifugiranje je postopek ločevanja, pri katerem s hitrim vrtenjem povzročimo, da se trdni delci v tekočini zberejo na dnu posode. S centrifugiranjem torej ločujemo zmesi, ki se razlikujejo v masi delcev, in sicer se težji delci naberejo na dnu posode, medtem ko lažji ostanejo zgoraj (Godec, Grubelnik, Glažar, Jamšek, & Zmazek, 2015).



Slika 13: centrifugiranje

1.3.3 TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA TLC

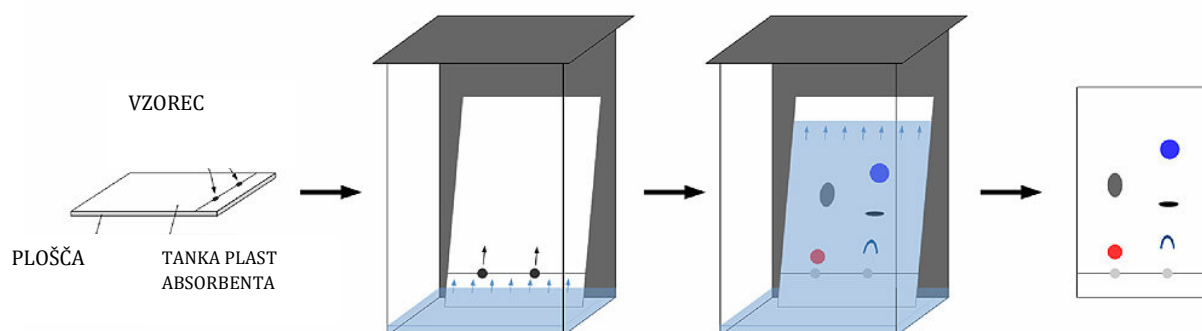
Tankoplastna kromatografija (krajše tudi TLC) je kromatografska tehnika, ki se uporablja za ločevanje komponent v mešanica. Tankoplastno kromatografijo izvedemo na plošči, ki je lahko iz različnih materialov (steklo, plastika, aluminijasta folija, papir). Plošča je prevlečena s tanko plastjo adsorbentega materiala, običajno je to silikagel, aluminijev oksid (Al_2O_3) ali celuloza. Slednjo plast absorbenta lahko imenujemo tudi stacionarna faza. Raztopljeni vzorec naneseemo z mikropipeto kot črtico ali piko na startno linijo, ki je primerno oddaljena od spodnjega roba plošče, in ga posušimo. Ločitev poteka v zaprti stekleni kromatografski komori, v kateri je na dnu mobilna faza. Ploščo postavimo vertikalno v posodo in topilo začne zaradi kapilarnosti potovati navzgor in z njim potujejo tudi snovi vzorca. Ko topilo pripotuje v bližino zgornjega roba, ploščo osušimo. Spojine po kromatografski ločbi napravimo vidne z orošanjem z različnimi reagenti ali z osvetlitvijo z UV-svetlobo (Anzelc, 2006).

Tankoplastno kromatografijo lahko uporabimo za identifikacijo komponent, ki so prisotne v zmesi, ter za določanje čistosti spojine. Bolj polarna komponenta se močneje veže na silikagel od nepolarnih komponent. Med kromatografskim procesom prihaja do adsorpcije in desorpcije molekul, pri čemer bolj polarne molekule zaradi pogostejših in močnejših interakcij s silikagelom po gelu potujejo počasneje od manj polarnih molekul, torej so na plošči nižje od manj polarne (Bele & Khale, 2010). Vsaki komponenti lahko določimo retenzijski faktor – R_f . To je hitrost, s katero se določena snov giblje po kromatografski plošči, v primerjavi s hitrostjo, s katero se giblje topilo. Lahko je manjši od ena ali pa ima vrednost ena.

Tankoplastna kromatografija sodi med adsorpcijske kromatografije (LSC). Zanje je značilna tekoča mobilna faza, stacionarna faza pa je trden adsorbent (Fakulteta za farmacijo, 2024).

$$R_f = \frac{\text{razdalja, ki jo preide snov}}{\text{razdalja, ki jo preide topilo}}$$

Enačba 1: enačba za izračun retenzijskega faktorja



Slika 14: TLC

Metoda je uporabna tudi za določanje ogljikovih hidratov v vzorcih česna.

1.3.4 LIOFILIZACIJA

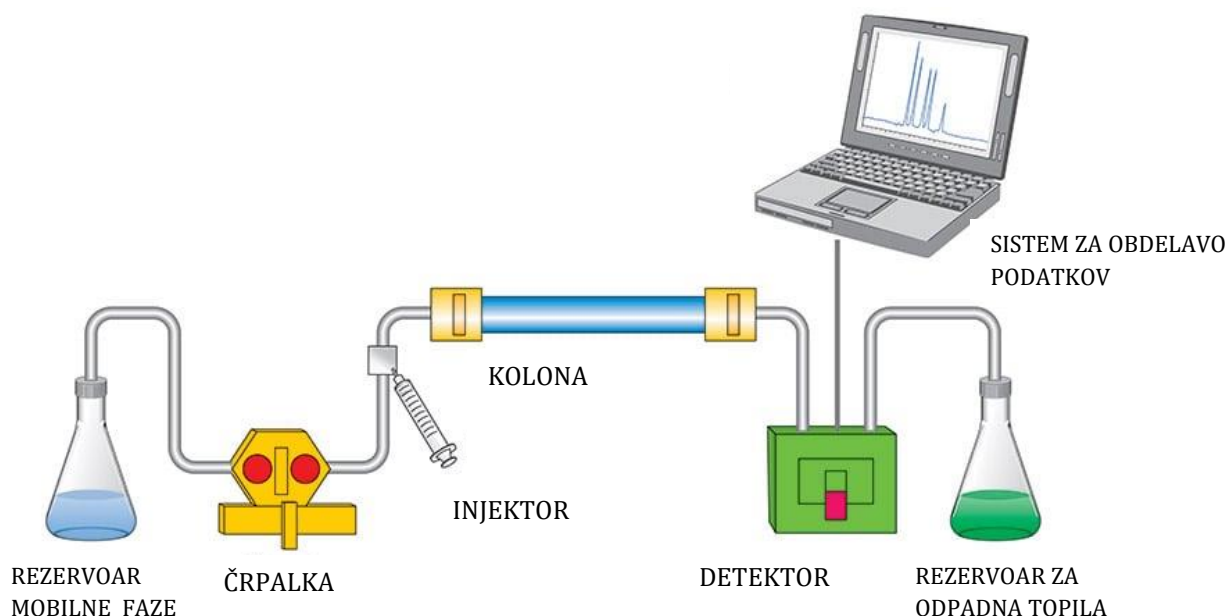
Postopek liofilizacije (ang. freeze-drying ali lyophilization) odstrani vodo iz zamrznjenega vzorca s sublimacijo in desorpcijo. Postopek lahko opišemo kot tristopenjski proces, ki je sestavljen iz zamrzovanja, primarnega sušenja in sekundarnega sušenja. Krioprotektanti zaščitijo beljakovine pred denaturacijo v zgodnjih fazah, medtem ko so lioprotektanti potrebni, da preprečujejo inaktivacijo beljakovin med sušenjem (Nath Gupta & Roy, 2010). Liofilizacija hrane in bioloških materialov ima tudi prednost, in sicer majhno izgubo arome in okusa. Postopek zahteva zelo nizek tlak ali vakuum, da se lahko doseže zadovoljiva hitrost sušenja biološkega materiala. Prva stopnja oziroma zamrzovanje je ključnega pomena za uspešnost celotnega postopka liofilizacije (Bruttini & Liapis I., 1995).

1.3.5 HPLC

HPLC oziroma tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) je postopek za ločevanje komponent iz mešanice kemijskih snovi. Komponente (topljenec) raztopimo in jih nato pod visokim pritiskom potiskamo skozi kolono, napolnjeno z delci polnila, ki so prekriti s stacionarno fazo, s pomočjo mobilne faze. Z izbiro ustreznih faz in ostalih pogojev dosežemo separacijo večkomponentne mešanice v nekaj minutah. Pri HPLC je pomembna izbira stacionarne in mobilne faze (Fakulteta za farmacijo, 2010).

Metoda je uporabna tudi za določanje 5-hidroksimetilfururala v vzorcih česna.

Retenzijski čas je čas, ki ga komponenta potrebuje za potovanje od injektorja do detektorja skozi kromatografsko kolono in je ob danih kromatografskih pogojih specifičen za določeno substanco (Grmek, 2011).



Slika 15: HPLC sistem

Rezervoar mobilne faze (topil) shranjuje zadostno količino mobilne faze za neprekinjeno delovanje (Žvab, 2021). Novejši HPLC sistemi so opremljeni s posebnimi filtri za zaščito topila pred zunanjimi vplivi in s sistemom za razplinjevanje. Ta sistem je pomemben, saj moramo mobilno fazo vedno prej razpliniti, drugače povzroči šum na detektorju. V primeru, da tega ni, se za razplinjevanje uporabi ultrazvočna kopel (Žvab, 2021).

Črpalka je poleg mobilne faze najpomembnejši del HPLC sistema. Njena naloga je, da neprekinjeno poganja mobilno fazo skozi sistem. Med več vrstami črpalk je najbolj uporabljena batna črpalka. Izokraska elucija je postopek poganjanja mobilne faze skozi kolono s črpalko, in sicer s konstantno sestavo. Pri gradientni eluciji pa se skozi sistem črpata dve ali več mobilnih faz. Gradientno elucijo se uporablja predvsem za ločevanje komponent z zelo različnimi časi zadrževanja v koloni (Žvab, 2021).

Injektor uporabljamo za vbrizgavanje določene količine vzorca v mobilno fazo pred vstopom v kolono. Ker ne smemo vplivati na polnitev, naneseemo vzorec na kolono naenkrat (Žvab, 2021).

Kolone so običajno jeklene cevke, dolge od 15 do 25 centimetrov in z notranjim premerom 4,6 centimetra. Kolona je glavni del HPLC sistema, v katerem poteka proces ločevanja. Kovinski filter v obliki porozne mreže, ki je na vsaki strani kolone, drži celice v koloni in omogoča prehajanje mobilne faze skozi kolono (Žvab, 2021).

Detektor v električni signal pretvori zaznano spremembo v fizikalni količini preiskovane snovi. Običajno uporabljamo pri HPLC pretočne detektorje. Pri detektorjih uporabljamo celice z manjšim volumnom, da zmanjšamo razširitev ozkih vrhov (Žvab, 2021).

Sistem za obdelavo podatkov je računalniški sistem za nadzor vseh parametrov HPLC inštrumenta. Zbira podatke iz detektorja, ki jih nato s primerim računalniškim programom interpretira v kromatogram. Kvalifikacijo in identifikacijo komponenta nam omogočajo ravno informacije o zadrževalnem času ter višini in ploščini vrha, ki jih najdemo na kromatogramu (Žvab, 2021).

1.3.6 UV-VIS SPEKTROSKOPIJA

UV-VIS spektroskopija oziroma ultravijolično vidna spektroskopija je podvrsta spektroskopije, ki temelji na absorpciji ultravijolične (UV) in vidne (VIS) svetlobe. UV-VIS spektroskopijo uporabljamo za merjenje količine diskretnih valovnih dolžin UV ali vidne svetlobe, ki jih vzorec absorbira ali prepušča v primerjavi z referenčnim vzorcem. Na to lastnost vpliva sestava vzorca, ki lahko zagotovi informacije o tem, kaj in v kolikšni koncentraciji je v vzorcu. Dobljene podatke lahko uporabimo za identifikacijo in analizo funkcionalnih skupin, koncentracije in elektronske ter geometrijske strukture molekule (Uredniki MN, 2023). Vsaka raztopina je obarvana, ker nekaj valovnih dolžin svetlobe absorbira, nekaj pa jih prepušča. Če vodi dodamo modro barvilo, bo absorbirala večino svetlobe, razen modre, ki jo bo prepuščala. Najpogosteje se za spektroskopijo uporablja merilno območje med 180 nm in 750 nm, ki se deli na UV (180 nm–360 nm) in VIS področje (360 nm–750 nm). Pri tem določamo odvisnost absorpcije energije obeh svetlob v odvisnosti od valovne dolžine.

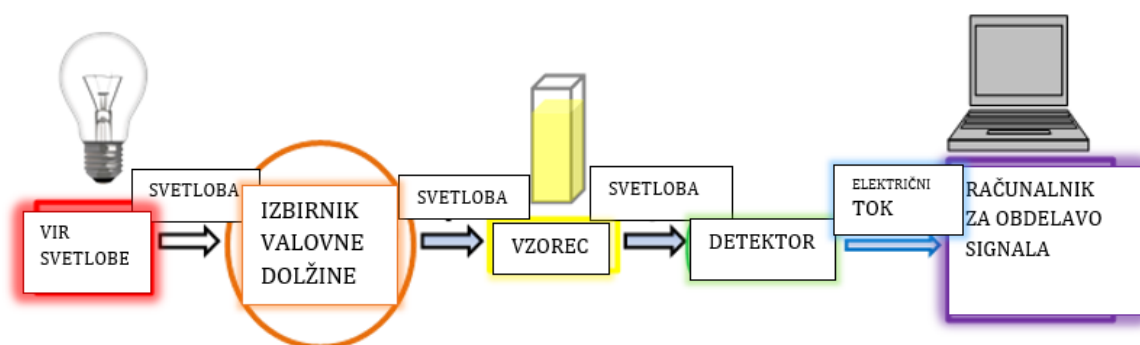
Absorpcija je proces, pri katerem kemijske spojine, ki se nahajajo v svetlobo propustnem mediju, selektivno sprejemajo določene frekvence elektromagnetnega sevanja. Delci preskočijo iz osnovnega v vzbunjeno stanje, in sicer tako, da absorbirajo fotone določenih valovnih dolžin in s tem pridobijo energijo. Ta preskok je opazen na izrisanem UV-VIS

spektru. Bolj koncentrirana raztopina bo absorbirala več svetlobe kot manj koncentrirana (na primer: več barvila bi dodali vodi, temnejša bi bila videti raztopina).

Z uporabo spektrofotometra lahko kvantitativno izmerimo absorpcijo ter ta podatek uporabimo pri določanju koncentracije absorbirajoče se molekule. Spektrofotometer deluje na principu svetlobe, ki izhaja iz svetilke in potuje skozi monokromator, kjer se razcepi v dve valovni dolžini. Nato skozi nastavljivo odprtino prepuščamo le eno valovno dolžino svetlobe, da doseže naš vzorec. Ta se nahaja v transparentni kiveti, na drugi strani le-te pa je slikovna elektronka, ki meri količino svetlobe, ki jo vzorec prepušča. Spektrofotometer torej meri količino svetlobe, ki jo raztopina prepušča. Večina spektrofotometrov avtomatsko izračuna absorpcijo brez enote, ob podajanju rezultatov pa navajamo valovno dolžino maksimalne absorpcije (npr. maksimalna absorpcija pri 260 nm) (Bajec & Tori, 2014).

Metoda je uporabna tudi za določanje melanoidinov in polifenolov v vzorcih česna.

Koncentracijo skupnih polifenolov določamo z uporabo Folin-Ciocalteu reagenta. Pri tem določamo koncentracijo -OH skupin v vzorcu s predpostavko, da absorbanca narašča v skladu z naraščanjem koncentracije -OH skupin. Metoda temelji na oksidacijsko-redukcijski reakciji, v kateri je Folin-Ciocalteu reagent (zmes fosformolibdenove in fosforvolframove kisline) dodan mediju in se z -OH skupinami reducira. To opazimo kot spremembo barve iz rumene v modro. Intenziteto modre barve proti slepemu vzorcu nato merimo spektrofotometrično pri valovni dolžini 765 nm. Količino skupnih polifenolov določimo s pomočjo predhodne priprave umeritvene krivulje. To pripravimo z uporabo znanih koncentracij galne kisline. S pomočjo te umeritvene krivulje lahko nato iz izmerjene absorbance določimo dejansko vsebnost skupnih polifenolov v vzorcu, podanih kot mg/L galne kisline. Metoda je relativno hitra in ekonomična ter zato široko uporabna (Gregorič, 2009).



Slika 16: : poenostavljena shema UV-VIS spektrofotometrije

2 NAMEN DELA

Namen našega dela je bil pridobiti podatke, ki nam bodo služili za optimizacijo procesa priprave črnega česna, in sicer kako hitro pri različnih temperaturah inkubacije česna potekajo procesi Maillardove reakcije ter nastanka tipičnih komponent črnega česna, kot so na primer melanoidini, polifenoli ter 5-hidroksimetilfural. Med pretvorbo česna poteka nekaj snovnih sprememb, ki se jih uspešno spremlja z uporabo tankoplastne kromatografije, spektroskopije in tekočinske kromatografije visoke ločljivosti. Osredotočili smo se predvsem na spremljanje vsebnosti sladkorjev, melanoidinov, polifenolov in 5-hidroksimetilfurala.

2.1 CILJI

Za našo raziskovalno nalogo smo si zastavili naslednje cilje:

- Preučiti črni česen, njegovo sestavo, njegov nastanek in ga primerjati s svežim česnom.
- Preučiti produkte Maillardove reakcije, ki poteče pri nastanku črnega česna iz svežega česna.
- S pomočjo literature preučiti najoptimalnejše pogoje za predelavo svežega česna v črnega.
- Spoznati in preizkusiti čim več metod, ki jih lahko uporabimo za preučevanje organskega materiala.
- Kvalitativno primerjati različne vzorce črnega česna po videzu.
- Kvantitativno in kvalitativno primerjati sestavo vzorcev črnega česna pri različnih temperaturah z ustrezno izbranimi metodami.

2.2 HIPOTEZE

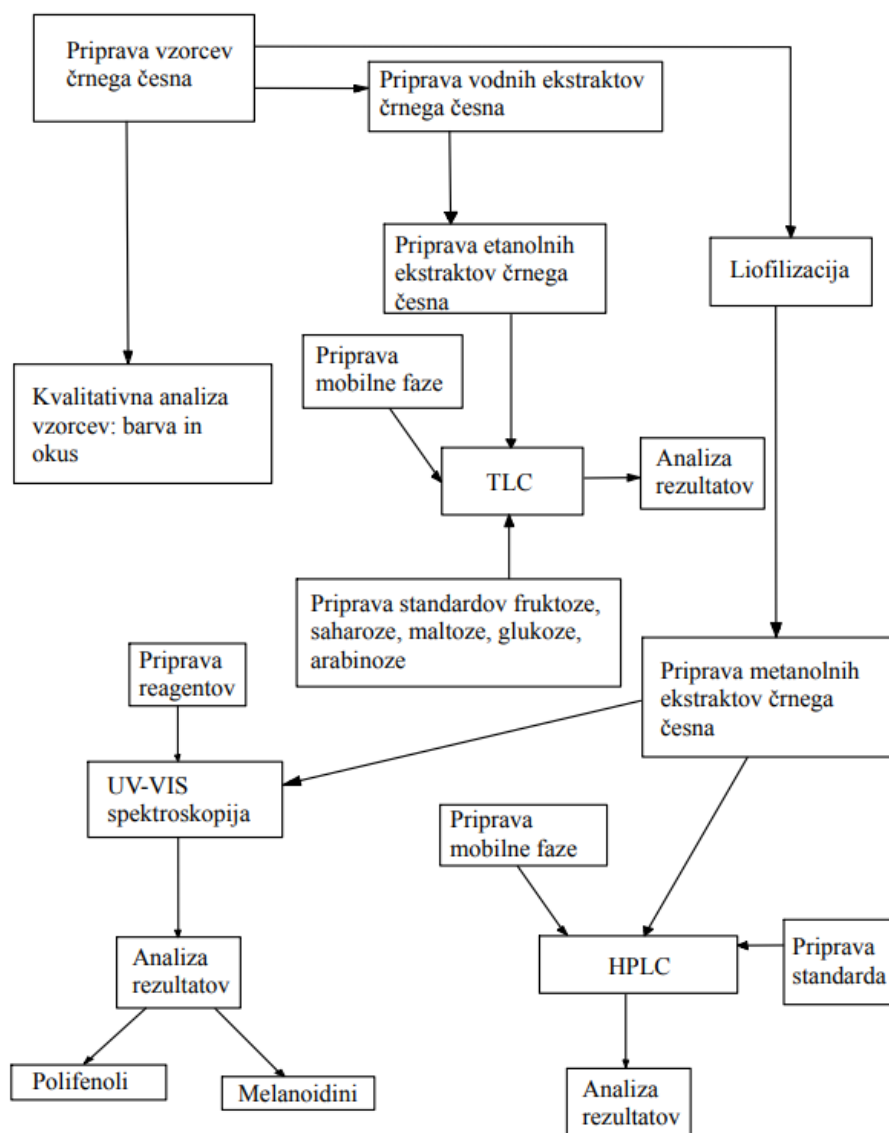
Pri naši raziskovalni nalogi smo si zastavili tudi nekaj hipotez, in sicer:

H1: Ključni procesni parametri priprave črnega česna v laboratorijskem merilu so ustrezni ter primerljivi s procesnimi parametri priprave črnega česna v večjem merilu.

H2: S svojimi poskusi priprave česna lahko dosežemo primerljive rezultate z rezultati iz literature, in sicer glede koncentracije sladkorjev, vsebnosti melanoidinov, polifenolov in 5-hidroksimetilfurala.

H3: S svojimi analiznimi postopki bomo dobili rezultate, ki bodo osnova za določitev parametrov procesa priprave črnega česna, konkretno temperature in trajanja, tudi z ozirom na specifičnost česna, ki smo ga uporabile v svojih poskusih.

2.3 SHEMA DELA



Slika 17: shema dela

2.4 NAČRT DELA

Proučevali smo staranje česna iste sorte (slovenski česnek, ki ga dobavlja podjetje Panorganix, d. o. o., iz Ljutomera). Česen bomo dali v zaprte posode, pri katerih je dno pokrito z vodo. Z dodatkom vode lahko nadzorujemo vlago, ki mora biti 80–90 %. Te posode bomo dali v sušilnik, in sicer eno na 60 °C, drugo pa na 90 °C. Na določeno število

dni (odvisno od temperature) bomo jemali vzorce glavic česna, dokler slednji ne bo do konca počrnel. Enak postopek bomo ponovili še za temperaturi 70 °C in 80 °C.

Tako bomo pridelali veliko vzorcev črnega česna, ki bodo potrebni za naše nadaljnje eksperimentalno delo. Vzorce bomo ustrezno označili in poimenovali.

3 EKSPERIMENTALNO DELO

3.1 PRIPRAVA VZORCEV ČRNEGA ČESNA

Vsi vzorci črnega česna so bili pripravljani po istem principu iz iste sorte česna. V posodo smo nalili toliko vode, da je slednja prekrila dno, in na dno položili kovinsko stojalo. Na vsako stojalo smo dali po 6 glav česna, ki smo jih predhodno stehtali. V posodo s česnom smo dali vlagomer in jo postavili v sušilnik, ki smo ga predhodno segreti na ustrezno temperaturo. To smo spremljali tudi s termometrom, ki smo ga vstavili v sušilnik. Če je vlaga v posodi padla pod 90 %, smo v posodo dolili vodo. Tako smo vzdrževali konstantno vlago pri vseh vzorcih. Vzorce smo iz sušilnika odvzemali, ko smo zaznali vidne spremembe (črnitev), zato so vzorci, ki so nastajali pri različnih temperaturah odvzeti v različnih časovnih intervalih. Naše serije so navedene v tabeli 2. Po postopku staranja smo vse vzorce zapakirali v papirnate vrečke in vzorce številsko označili z alkoholnim flomastrom. Svež česen je dobil oznako 00.

Tabela 2: priprava vzorcev črnega česna

T [60 °C] Začetek: 11. 4.		T [70 °C] Začetek: 9. 5.		T [80 °C] Začetek: 18. 5.		T [90 °C] Začetek: 11. 4.	
Oznaka vzorca	Odvzem	Oznaka vzorca	Odvzem	Oznaka vzorca	Odvzem	Oznaka vzorca	Odvzem
01	19. 4. 2023 8 dni	11	12. 5. 2023 3 dni	21	19. 5. 2023 1 dan	31	13. 4. 2023 2 dni
02	26. 4. 2023 15 dni	12	15. 5. 2023 6 dni	22	22. 5. 2023 4 dni	32	14. 4. 2023 3 dni
03	3. 5. 2023 22 dni	13	16. 5. 2023 7 dni	23	23. 5. 2023 5 dni	33	19. 4. 2023 8 dni
04	18. 5. 2023 37 dni	14	17. 5. 2023 8 dni	24	24. 5. 2023 6 dni		
				25	25. 5. 2023 7 dni		



Slika 18: priprava vzorcev črnega česna v šolskem sušilniku

3.2 MATERIALI

3.2.1 PRIPOMOČKI IN NAPRAVE

- steklena posoda, ki je odporna na visoke temperature s pokrovom (2-krat)
- nizko kovinsko stojalo (2-krat)
- termometer (2-krat)
- vlagomer (2-krat)
- alkoholni flomaster
- papirnata vrečka (21-krat)
- žlička
- nož
- spatula
- terilnica (2-krat)
- pestilo (2-krat)
- velike epruvete za centrifugiranje
- analitska tehtnica (Mettler Toledo)
- TLC-plošče (TLC, silikagelska (60) F254 plošča) (5-krat)
- merilni valj
- merilna bučka (6-krat)
- mikro pipeta
- kapilare (2 μL , 5 μL)

- centrifuga (Eppendorf MiniSpin®/ MiniSpin® plus – Mini Centrifuge)
- kromatografska kad
- filter papir (5-krat)
- sušilnik
- sušilnik za lase
- liofilizator
- merilna bučka (6-krat)
- merilna pipeta (5-krat)
- pipetirna žogica
- ultrazvočna kopel (S 30 H Elmasonic – Elma)
- membranski filtri Milipore s porami velikosti 0,45 µm
- injekcijske brizge za filtracijo in injiciranje vzorcev
- spektrofotometer
- brizgalke
- 50 mL centrifugirke
- 15 mL centrifugirke
- 1,5 mL centrifugirke
- plošča za spektroskopijo
- pipete (200 µL , 500 µL, 1000 µL)
- celulozni papir
- aparatura za HPLC analizo: črpalka, injektor, DAD detektor (Agilent Technologies, CA, ZDA, serija 1100)
- kolona Agilent Eclipse XDB-C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm
- vialne s pokrovčki [2 mL] (Agilent Technologies, CA, ZDA)
- injekcijske brizge
- filtri 25/0,2 µm PTFE (Agilent Technologies, CA, ZDA)
- hladilnik
- analitska tehtnica (KERN)
- tehtalna ladjica
- čaše
- mikropipeta [100 µL] (Biohit)
- reagenčna steklenica [2 L]

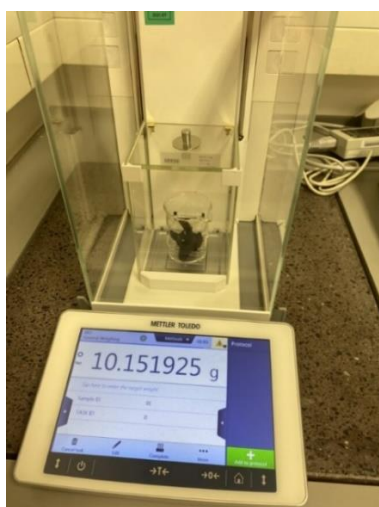
3.2.2 KEMIKALIJE

- milli-Q destilirana voda
- fruktoza (CAS številka: 57-48-7): referenčna substanca (R)
- glukoza (dekstroza) (CAS številka: 50-99-7): referenčna substanca
- laktoza monohidrat (CAS številka: 64044-51-5): referenčna substanca (R)
- saharoza (sukroza) (CAS številka: 57-50-1): referenčna substanca (R)
- maltoza
- arabinoza
- metanol (Pro Analysis)
- brezvodna očetna kislina (minimalno 99,6- %, Pro Analysis)
- etanol (96-%, Pro Analysis)
- žveplova (VI) kislina (95–97- %, Pro Analysis)
- timol (Pro Analysis)
- orosilni reagent (0,5 g timola, raztopljenega v mešanici etanola)
- metanol (70-%, Pro Analysis)
- Folin in Ciocalteu fenol reagent
- natrijev karbonat dekahidrat ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
- galna kislina ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$)
- standard 5-hidroksimetil furfural, $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3$ ($M_r = 126,11$), CAS: 67-47-0, Sigma Aldrich, ZDA
- metanojska kislina, HCOOH , Sigma Aldrich, ZDA
- CH_3CN , LC-MS CHROMASOLV, ³99,9 %, Honeywell, Riedel-de-Haën
- etanol, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, Sigma Aldrich, ZDA
- mobilna faza A: $\text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} = 1 : 999$ (V/V)
- mobilna faza B: $\text{HCOOH} : \text{CH}_3\text{CN} = 1 : 999$ (V/V)

3.3 POSTOPKI

3.3.1 PRIPRAVA VODNIH EKSTRAKTOV

Od vseh vsakega vzorcev smo odvezi tri stroke in jih stehtali. Vse vzorce smo nato narezali na majhne koščke in dodali 5 mL destilirane vode ter jih v terilnici s pestilom zmleli do fine homogene mase. Terilnico smo pred vsakim vzorcem ustrezno očistili z destilirano vodo in posušili. Nato smo s spatulo postrgali zmes iz terilnice in jo prenesli v centrifugirke ter gostejše vzorce redčili z dodatnimi 5 mL destilirane vode (Slika 20: Homogenizirani vzorci črnega česna). V terilnico smo dolili še 5 mL destilirane vode, da smo vse temeljito splaknili in ostanek prenesli v centrifugirko. S postopnim dodajanjem destilirane vode smo dosegli minimalne izgube mase stehtanega vzorca. Naš organski materialV vsak vzorec smo torej dodalimo tako raztopili v najmanj 5 do največ 10 mL destilirane vode. Postopek je bil ponovljen za vse vzorce. Alikvot vsakeg vzorca ($n \times 1$ mL v mikrocentrifugirkah) smo nato centrifugirali pri $10.000 \times G$. Vodotopne sestavine v supernatantu (vodni ekstrakt) smo po centrifugiranju vzorca shranili. Vodni ekstrakti so bili po postopku shranjeni v zamrzovalniku.



Slika 19: tehtanje



Slika 20: priprava vodnih ekstraktov



Slika 21: delovna površina



Slika 22: vodni ekstrakti

3.4 DOLOČANJE SLADKORJEV S POMOČJO TANKOPLASTNE KROMATOGRAFIJE

- topilo: voda : metanol = 2 : 3 (V/V)
- orosilni reagent: 0,5 g timola v topilu (etanol, 96-% : žveplova (VI) kislina = 95 : 5); (V/V)

3.4.1 PRIPRAVA STANDARDOV

Raztopine standardov različnih sladkorjev smo pripravili v 20 mL merilnih bučkah, v katere smo zatehtali po 10 mg posameznega sladkorja in ga raztopili v 70-% etanolu. Pripravili smo raztopine petih različnih sladkorjev: saharoze, fruktoze, maltoze, arabinoze in glukoznega sirupa.

3.4.2 PRIPRAVA VZORCEV

Vzorci smo pripravili tako, da smo v manjše centrifugirke odtehtali 5,0 g vodnega ekstrakta. V centrifugirko smo dodali 5 ml 70-% etanola ter dobro premešali. Potem smo dodali še 25 mL 70-% etanola in zopet premešali. Vzorce smo 10 minut centrifugirali na 10000 G, bistro tekočino prenesli v 1,5 mL centrifugirke in vsebino uporabili za nanos na TLC plošče. Najbolj obarvane vzorce (03, 04, 13, 14, 23, 24, 25, 31, 32, 33) smo tudi redčili, in sicer tako, da smo odmerili 10 μ L že prej centrifugiranega vzorca in mu dodali še 40 μ L topila (70-% etanol). Dobili smo torej še 10 redčenih vzorcev.

3.4.3 PRIPRAVA MOBILNE FAZE IN KROMATOGRFSKE KADI

Za mobilno fazo smo uporabili vodo, metanol, brezvodno očetno kislino in etilenklorid v sledečem volumskem razmerju:

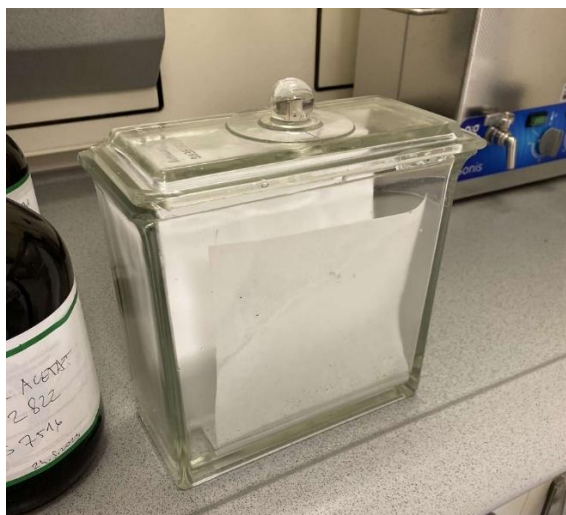
voda : metanol : brezvodna očetna kislina : etilenklorid = 20 mL : 30 mL : 50 mL : 100 mL.

Ko smo pripravili mobilno fazo, smo kromatografsko kad obložili s filter papirjem in vanjo zlili mobilno fazo. Pustili smo, da se filter papir nasiti z mobilno fazo.

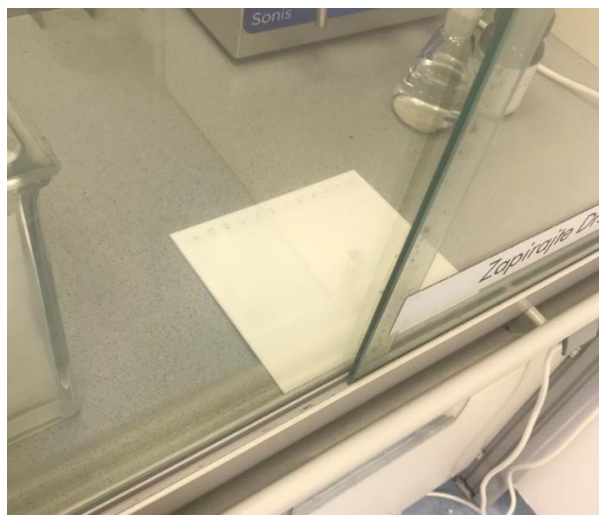
3.4.4 PRIPRAVA TLC PLOŠČ in RAZVIJANJE KROMATOGRAMOV

Pripravili smo štiri TLC plošče, tako da smo 2 cm od spodnjega roba narisali startno linijo, na katero smo na razdalji 1,3 cm, ločeno v točkah, nanесли po 2 μ L raztopin standardov in vzorcev. Na eno ploščo smo tako lahko razporedili pet raztopin standardov (saharozo, glukozni sirup, fruktozo, maltozo in arabinozo), vzorec česna brez obdelave (00) in osem vzorcev obdelanega, črnega česna. Predpostavili smo, da se pri neredčenih vzorcih komponente ne bodo lepo ločile, zato smo jih redčili. Odločili smo se, da ne bomo redčili vseh vzorcev, temveč samo tiste, ki so bili izrazito temnejše barve, saj v literaturi piše, da ima česen, ki je bolj črn oziroma dlje obdelan pri višji temperaturi, več sladkorjev.

Ko so se vse lise na TLC ploščah posušile, filter papir pa je bil nasičen z mobilno fazo, smo v kromatografsko kad dali naše TLC plošče. Plošče smo pustili v kadi, dokler ni prišla mobilna faza preko 2/3 plošče (približno eno uro). Potem smo plošče pobrali iz kadi, označili mejo, do katere je prišla mobilna faza, in jih nesli razvit. Najprej je bilo treba ploščo osušiti s fenom, nato pa suho ploščo enakomerno orositi z 0,5 grama timola v topilu (etanol, 96-% : žveplova (VI) kislina = 95 : 5). in to v sušilniku za TLC plošče segrevati še 10 min na 130 °C. Plošče smo ocenjevali pri dnevni svetlobi.



Slika 23: kromatografska kad z mobilno fazo



Slika 24: sušenje TLC plošče

Izmerili smo razdaljo, ki jo je prepotovala mobilna faza, prav tako tudi vsi sladkorji v standardih in vzorcih. S pomočjo meritev smo določili retenzijske faktorje in sklepali na prisotnost posameznih sladkorjev v vzorcih.

3.5 LIOFILIZACIJA

Za 15 vzorcev smo stehali 3 stroke česna in jih dali v centrifugirke. Vseh 15 odprtih centrifugirk smo zložili na pladenj in jih dali v liofilizator. Po 48 urah smo pladenj vzeli ven in ponovno stehali maso česna, da smo dobili vrednost, koliko mase je česen izgubil med procesom liofilizacije. Po teksturi je bil česen po 48 urah še vedno vlažen in lepljiv, kar nas je presenetilo, saj smo pričakovali suh česen, lažji za obdelavo. Liofilizirane stroke česna smo uporabili za spektroskopijo in HPLC.

Rezultati tehtanja in razlike v masi pred liofilizacijo in po njej so predstavljeni v tabeli 3.

Tabela 3: rezultati tehtanja in razlike v masi pred liofilizacijo in po njej

Oznaka vzorca	Skupna masa* [g]	Pred liofilizacijo [g]	Po liofilizaciji [g]	Razlika [g]	Razlika v odstotkih [%]
00	26,4	23,1	12,58	10,52	45,54
01	16,66	4,1	2,84	1,26	30,73
02	25,96	14	12,14	1,86	13,29
03	30,37	20,2	16,55	3,65	18,07
04	26,23	15,5	12,41	3,09	19,94
11	19,48	9,2	5,66	3,54	38,48
12	22,83	11,1	9,01	2,09	18,83
13	22,24	9,6	8,42	1,18	12,29
14	21,71	12,7	7,89	4,81	37,87
21	25,06	13,9	11,24	2,66	19,14

22	22,79	12,6	8,97	3,63	28,81
23	21,94	11,3	8,12	3,18	28,14
25	21,69	12,2	7,87	4,33	35,49
32	17,91	4,5	4,09	0,41	9,1
33	22,64	9,2	8,82	0,38	4,1

*Skupna masa je masa centrifugirke in česna po liofilizaciji. Od te mase smo odšteli povprečno maso centrifugirk, da smo dobili maso česna po liofilizaciji.

Da smo lahko od skupne mase odšteli maso centrifugirk, smo jih predhodno 7 stehtali in izračunali njihovo srednjo vrednost.

Rezultati so predstavljeni v tabeli 4.

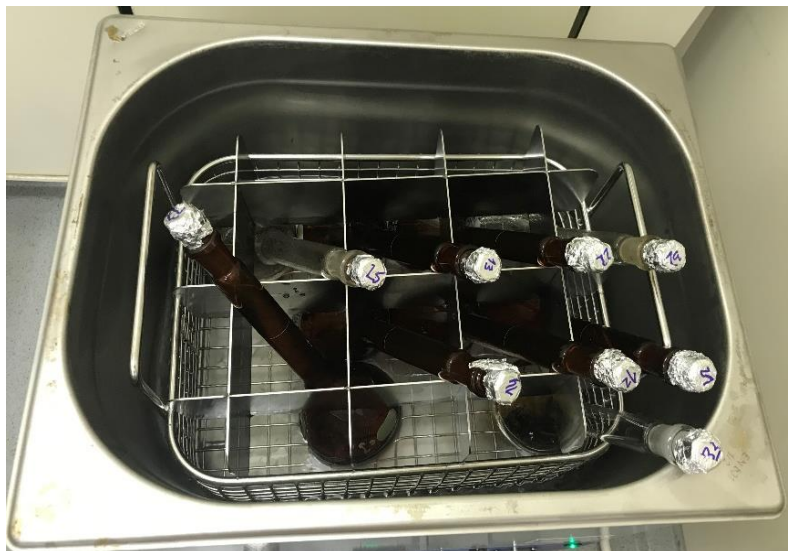
Tabela 4: povprečna masa 50 mL centrifugirk

Mase centrifugacijskih epruvet [g]	Povprečna masa [g]	Razlika mase [g]	Povprečna napaka
13,76	13,82	0,06	0,15
13,82		0	
14,12		0,3	
14,05		0,23	
13,66		0,16	
13,67		0,15	
13,64		0,18	

3.6 DOLOČANJE MELANOIDINOV IN POLIFENOLOV Z UV-VIS SPEKTROSKOPIJO

3. 6. 1 PRIPRAVA METANOLNIH EKSTRAKTOV

Za spektroskopijo smo pripravili metanolne ekstrakte iz liofiliziranega česna. Najprej smo iz vsake izmed 15 epruvet vzeli po dva liofilizirana stroka česna in jih stehtali. Nato smo stroke česna narezali na izredno majhne koščke in jih dali v 100 mL merilne bučke. Potem smo z merilno pipeto v vsako bučko dodali 10 mL 70-% raztopine metanola. Zmes smo najprej dobro premešali ročno in kasneje bučke dali za 25 minut v ultrazvočno kopel, da bi bil proces ekstrakcije hitrejši.



Slika 25: ultrazvočna kopel

Volumni metanolnih ekstraktov so napisani v tabeli 5.

Tabela 5: masne bilance metanolnih ekstraktov

Oznaka vzorca	Stehtana dva stroka [g]	MeOH [mL]	Volumen metanolnih ekstraktov [mL]
00	2,26	10,0	12,26
01	2,93	10,0	12,93
02	3,89	10,0	13,89
03	6,33	10,0	16,33
04	5,78	10,0	15,78
11	4,20	10,0	14,20
12	3,33	10,0	13,33
13	5,06	10,0	15,06
14	3,12	10,0	13,12
21	4,34	10,0	14,34
22	3,45	10,0	13,45
23	3,05	10,0	13,05
25	4,98	10,0	14,98
32	4,06	10,0	14,06
33	2,25	10,0	12,25

V prvi fazi smo vzorce s pomočjo brizge in celuloznega papirja na grobo prefiltrirali v 50 mL centrifugirke. Postopek filtriranja smo nadaljevali s filtriranjem vzorcev skozi filtrirne frite z velikostjo celuloznih por 0,45 μm in ekstrakt prefiltrirali v nove centrifugirke. Ta postopek smo ponovili za vseh 15 ekstraktov. Dobili smo prefiltrirane metanolne ekstrakte, ki smo jih v nadaljevanju uporabili za določanje polifenolov in melanoidinov.



Slika 26: filtriranje

3. 6. 2 MELANOIDINI

Prisotnost melanoidinov v črnem česnu smo ugotavljali s pomočjo UV-VIS spektrofotometrije. Iz literature (Nakagawa, Maeda, Yamaya, & Tonosaki, 2020) smo izvedeli, da ima melanoidin širok absorpcijski spekter, in sicer od 200 do 500 nm. Zato smo posneli absorbanco pri 280, 360 in 420 nm. Predvsem smo se osredotočili na analizo vzorcev pri 60 °C, saj je iz literature (Ahmed & Wang, 2021) razvidno, da je največ primerkov črnega česna obdelano pri tej temperaturi, iz česar smo sklepali, da je to najugodnejša temperatura za predelavo svežega česna v črnega.

3.6.3 POLIFENOLI

Metoda merjenja UV-VIS spektroskopija temelji na absorbanci svetlobe, ki jo povzroči interakcija med polifenoli in elektromagnetnim valovanjem. Za določanje vsebnosti polifenolov smo morali najprej pripraviti različno koncentrirane raztopine galne kisline, s katerimi smo lahko izrisali umeritveno krivuljo. Izbor galne kisline kot umeritvenega standarda omogoča pridobivanje uporabnih skupnih podatkov o polifenolih. Polifenoli v metanolnem ekstraktu črnega česna se določajo s pomočjo Folin in Ciocalteu fenol reagenta. Ko se reagent doda k vzorcu, ki vsebuje fenolne spojine, pride do kemijske reakcije med polifenoli in reagentom. Fenolne spojine reducirajo kompleks fosfomolibdenske in fosfovolframova kisline, ki sestavlja reagent, pri čemer nastane

modro obarvani kompleks (ISO (the International Organization for Standardization), 2005).

3.6.3.1 PRIPRAVA RAZTOPIN GALNE KISLINE ZA UMERITVENO KRIVULJO

V 100 mL bučko smo zatehtali 0,1 g standarda galne kisline in ga raztopili v vodi (1 mg/mL). Galno kislino smo za 30 minut dali v ultrazvočno kopel, da se je vsa raztopila. Z redčenjem tako pripravljene standardne raztopine (tabela 7) smo v 10 mL merilnih bučkah pripravili raztopine standarda z različnimi masnimi koncentracijami (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µg/mL).

Redčitve galne kisline so prikazane v tabeli 6.

Tabela 6: redčitvena vrsta galne kisline

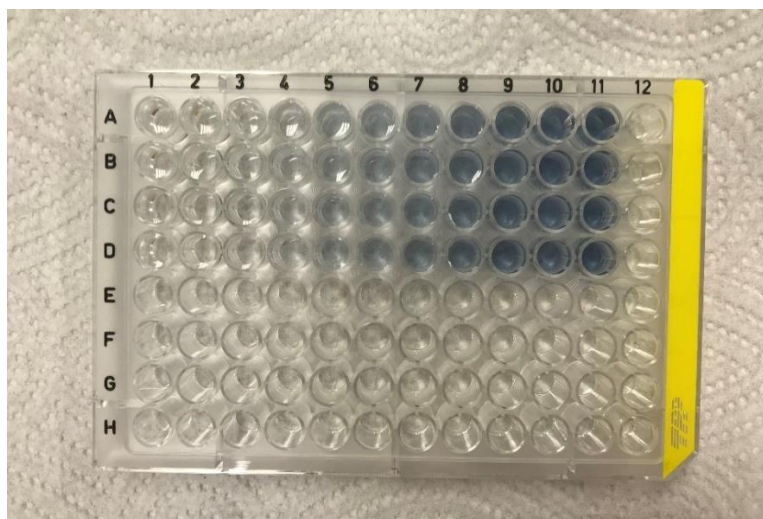
Volumen galne kisline [mL]	Masna koncentracija standarda [µg/mL]	Množinska koncentracija [mol/L]
0,1	10	$5,88 \cdot 10^{-5}$
0,2	20	$1,18 \cdot 10^{-4}$
0,3	30	$1,76 \cdot 10^{-4}$
0,4	40	$2,35 \cdot 10^{-4}$
0,5	50	$2,94 \cdot 10^{-4}$
0,6	60	$3,53 \cdot 10^{-4}$
0,7	70	$4,11 \cdot 10^{-4}$
0,8	80	$4,70 \cdot 10^{-4}$
0,9	90	$5,29 \cdot 10^{-4}$
1	100	$5,88 \cdot 10^{-4}$

Nato smo vzeli 22 1,5 mL centrifugirk in jih razdelili v dve vrsti. V vsako centrifugirko smo dali po 100 µL pripravljenih raztopin galne kisline (po vrsti, po koncentraciji le-te, v eno pa smo namesto galne kisline dali vodo) in centrifugirke zaprli ter dobro premešali. Nato smo vsaki dodali še 500 µL 10 % Folin in Ciocalteu fenol reagenta, ki smo ga pripravili tako, da smo 5 mL reagenta razredčili s 45 mL vode in premešali, jih zaprli in trikrat premešali. Navsezadnje smo dodali 400 µL raztopine natrijevega karbonata, ki smo jo pripravili tako, da smo 37,50 g trdnega natrijevega karbonata dali v 500 mL čašo. Najprej smo karbonatu dodali toplo vodo do polovice in premešali, da se je natrijev karbonat raztopil. Nato smo raztopino ohladili na sobno temperaturo, jo razredčili do 500 mL in

zmešali. Po dodanem natrijevem karbonatu smo epruvete spet zaprli in trikrat premešali. Vse skupaj smo pustili inkubirati 45 minut. Potem smo v ploščo za spektrofotometrijo odpipetirali po 300 μL inkubirane zmesi. Meritve smo izvedli za vsako redčitev v dveh paralelkah. Iz meritev, ki smo jih izmerili pri valovni dolžini 765 nm, smo narisali umeritveno krivuljo za polifenole. Absorbance smo dobili iz Lambert-Beerovega zakona, kjer A predstavlja absorbanco, ε predstavlja absorpcijsko konstanto snovi, l dolžino poti svetlobe in c koncentracijo absorbirajočih delcev v raztopini.

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

Enačba 2: Lambert-Beerov zakon



Slika 27: plošča s standardnimi raztopinami po uporabi Folin in Ciocalteu fenol reagenta

3.6.3.2 VZORCI

Za merjenje vsebnosti melanoidinov in polifenolov smo naredili 4 redčitve metanolnih ekstraktov, da bi našli optimalno redčitev za vsak vzorec glede na našo umeritveno krivuljo. Za prvo redčitev smo vzeli po 200 μL vsakega ekstrakta in vsem dodali po 800 μL vode. Zmes smo trikrat premešali in standardno vrsto označili z E1. Nato smo iz vrste E1 vzeli po 500 μL vsakega ekstrakta in jih razredčili tako, da smo vsakemu ekstraktu dodali še 500 μL vode. To redčitveno vrsto smo poimenovali E2. Iz redčitvene vrste E2 smo vzeli po 300 μL vzorcev 03, 04, 11, 13, 14, 22 in 23 in jim dodali 300 μL vode, saj so bili ti vzorci še preveč temni. To redčitveno vrsto smo poimenovali E3. Za vzorce 25, 32 in 33 pa smo iz redčitvene vrste E2 vzeli po 300 μL vzorca ter dodali 1200 μL vode, saj so bili to najtemnejši vzorci. To redčitveno vrsto smo poimenovali E4. Iz redčitvene vrste E1 smo pipetirali 100 μL vsakega ekstrakta v novih 15 majhnih centrifugirk, dodali 500 μL Folin in Ciocalteu fenol reagenta, narejenega po istem postopku kot za standardne raztopine,

trikrat premešali in pustili 10 minut. Nato smo dodali še 400 μ L natrijevega karbonata, narejenega enako kot pri standardnih raztopinah, centrifugirke spet zaprli, označili in spet trikrat premešali. Zdaj smo zmes pustili 30 minut. Po 30 minutah smo na ploščo za spektrofotometrijo odpipetirali po 300 μ L vsakega vzorca. Na ploščo smo odpipetirali tudi po 300 μ L redčenih vzorcev brez reagenta in vodo z reagenti, ki so predstavljali ozadje naših meritev. Postopek smo ponovili še za redčitvene vrste E2, E3 in E4. Plošče smo dali posneti na 765 nm.

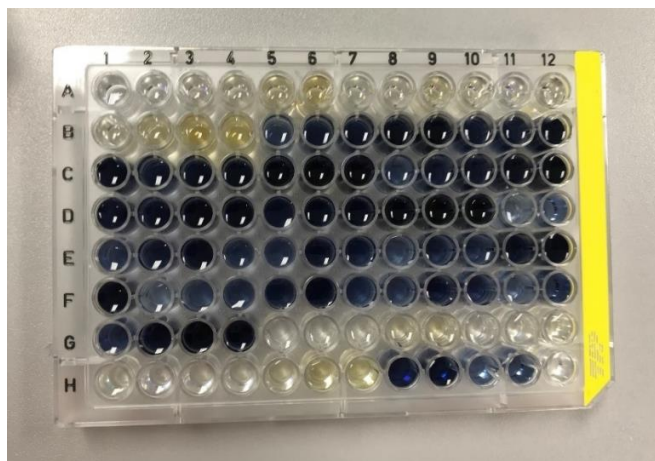
Postavitev na eni izmed plošč, ki smo jo posneli, je predstavljena v tabeli 7.

Tabela 7: vzorci na plošči za UV-VIS spektroskopijo

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	V + R	00 E1	01 E1	02 E1	03 E1	04 E1	11 E1	12 E1	13 E1	14 E1	21 E1	22 E1
B	23 E1	25 E1	32 E1	33 E1	00 E1 R	01 E1 R	02 E1 R	03 E1 R	04 E1 R	11 E1 R	12 E1 R	13 E1 R
C	14 E1 R	21 E1 R	22 E1 R	23 E1 R	25 E1 R	32 E1 R	33 E1 R	00 E1 R	01 E1 R	02 E1 R	03 E1 R	04 E1 R
D	11 E1 R	12 E1 R	13 E1 R	14 E1 R	21 E1 R	22 E1 R	23 E1 R	25 E1 R	32 E1 R	33 E1 R	00 E2 R	01 E2 R
E	02 E2 R	03 E2 R	04 E2 R	11 E2 R	12 E2 R	13 E2 R	14 E2 R	21 E2 R	22 E2 R	23 E2 R	25 E2 R	32 E2 R
F	33 E2 R	00 E2 R	01 E2 R	02 E2 R	03 E2 R	04 E2 R	11 E2 R	12 E2 R	13 E2 R	14 E2 R	21 E2 R	22 E2 R
G	23 E2 R	25 E2 R	32 E2 R	33 E2 R	00 E2	01 E2	02 E2	03 E2	04 E2	11 E2	12 E2	13 E2
H	14 E2	21 E2	22 E2	23 E2	25 E2	32 E2	33 E2	01 E1 G	02 E1 G	01 E2 G	02 E2 G	V + R

Legenda:

- V – voda
- R – reagenti (Folin in Ciocalteu fenol reagent in natrijev karbonat)
- E1 – redčitev 1, E2 redčitev 2
- G – galna kislina
- Število v tabeli – številka vzorca



Slika 28: vzorci na plošči za spektroskopijo

Postavitev na končni plošči, katere vrednosti smo uporabili za analizo, predstavlja tabela 8.

Tabela 8: končna plošča za UV-VIS spektroskopijo

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	V+ R	00 E2	01 E2	02 E2	03 E3	04 E3	11 E3	12 E2	13 E3	14 E3	21 E2	22 E3
B	23 E3	25 E4	32 E4	33 E4	00 E2 R	01 E2 R	02 E2 R	03 E3 R	04 E3 R	11 E3 R	12 E2 R	13 E3 R
C	14 E3 R	21 E2 R	22 E3 R	23 E3 R	25 E4 R	32 E4 R	33 E4 R	00 E2 R	01 E2 R	02 E2 R	03 E3 R	04 E3 R
D	11 E3 R	12 E2 R	13 E3 R	14 E3 R	21 E2 R	22 E3 R	23 E3 R	25 E4 R	32 E4 R	33 E4 R	V+ R	/

Legenda:

- V – voda
- R – reagenti (Folin in Ciocalteu fenol reagent in natrijev karbonat)
- E2 – redčitev 2, E3 – redčitev 3, E4 – redčitev 4
- Število v tabeli – številka vzorca

3.7 DOLOČANJE 5-HIDROKSIMETILFURFURALA S HPLC

Za analizo smo uporabili HPLC sistem (Agilent Technologies, CA, ZDA, serija 1100) z DAD detektorjem, ki je podprt s programsko opremo Chemstation, verzija 9.01.



Slika 29: šolski HPLC sistem

Za identifikacijo 5-hidroksimetilfurfurala je v literaturi (Nakagawa, 2020) uporabljena ACQUITY UPLC HSS T3 kolona (150 mm x 2,1 mm, 1,8 mm, Waters corporation, MA, USA). Ker v šoli ne razpolagamo s tovrstno kolono, smo za identifikacijo izbrali kolono Agilent Eclipse XDB-C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m).

Pogoji izvedbe analize:

- temperatura kolone: 25 °C
- avtosampler: 10 °C
- pretok: 0,65 mL/min
- detekcija pri $\lambda = 280$ nm
- volumen injiciranja: 1,0 μ L
- čas analize: 15 minut

Gradientna elucija:

Tabela 9: gradientna elucija

t (min)	Mobilna faza A (%)	Mobilna faza B (%)
0-1	99	1
1-10	99-70	1-30
10-12	70-35	30-65
12-15	99	1

3.7.1 PRIPRAVA STANDARDA ZA HPLC ANALIZO

Pripravili smo raztopino standarda (S_0). 15,24 mg standarda 5-hidroksimetil furfurala smo raztopili v 10 mL metanola. Z redčenjem standardne raztopine S_0 smo pripravili raztopine standarda z različnimi masnimi koncentracijami.

Pripravljene raztopine standardov smo primerno označili ($S_1, S_2, S_3, S_4, S_5, S_6, S_7$) in jih prefiltrirali v 2 mL vialo skozi filter z velikostjo por 0,2 μm . Tako pripravljene raztopine standardov smo uporabili za HPLC analizo.

Tabela 10: masna koncentracija raztopin standardov

Oznaka raztopin standarda	Masna koncentracija [g/L]
S_1	0,15240
S_2	0,01524
S_3	0,04572
S_4	0,03048
S_5	0,01524
S_6	0,01524
S_7	0,00762

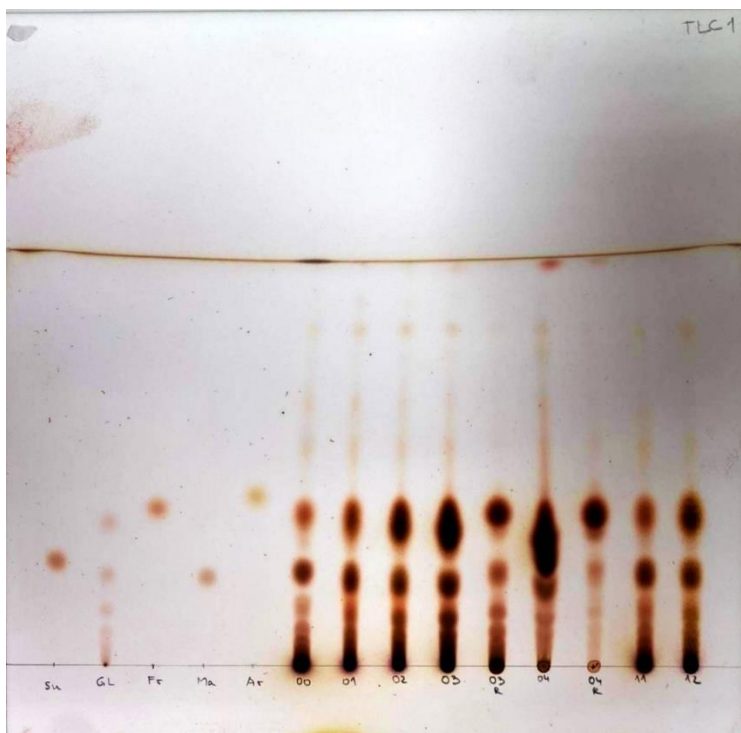
Pri pogojih, ki so navedeni v literaturi (Nakagawa, 2020), smo posneli kromatograme topila metanola in vseh raztopin standardov. S pomočjo meritev površin pod kromatografskimi piki smo izrisali umeritveno krivuljo.

3.7.2 PRIPRAVA VZORCEV ZA HPLC ANALIZO

Metanolne ekstrakte, ki smo jih pripravili iz liofiliziranega vzorca česna, smo prefiltrirali v 2 mL vialo skozi filter z velikostjo por 0,2 μm . Tako pripravljenim vzorcem smo posneli kromatograme in s pomočjo površin pod kromatografskimi piki iz umeritvene krivulje določili vsebnost 5-hidroksimetil furfurala.

4 REZULTATI

4.1 TLC

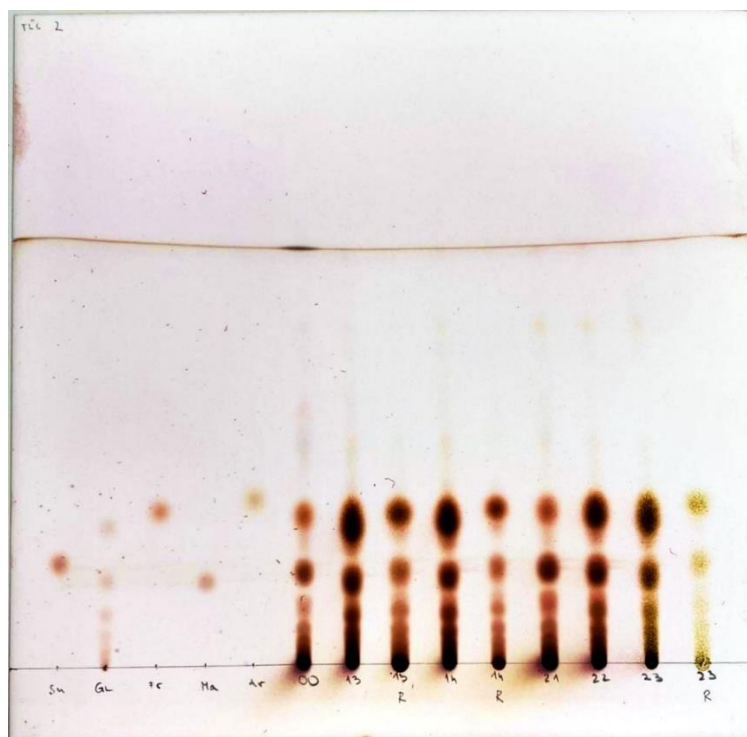


Slika 30: TLC plošča s standardi, vzorcem svežega česna (00) in prvimi šestimi vzorci (01, 02, 03, 03 R, 04, 04 R, 11, 12)

Legenda:

Tabela 11: pozicije vzorcev na plošči TLC 1

Pozicija na plošči	Kratica	Celotno ime
1	Su	saharoza
2	Gl	glukozni sirup
3	Fr	fruktoza
4	Ma	maltoza
5	Ar	arabinoza
6	00	vzorec 00
7	01	vzorec 01
8	02	vzorec 02
9	03	vzorec 03
10	03 R	vzorec 03 redčen
11	04	vzorec 04
12	04 R	vzorec 04 redčen
13	11	vzorec 11
13	12	vzorec 12

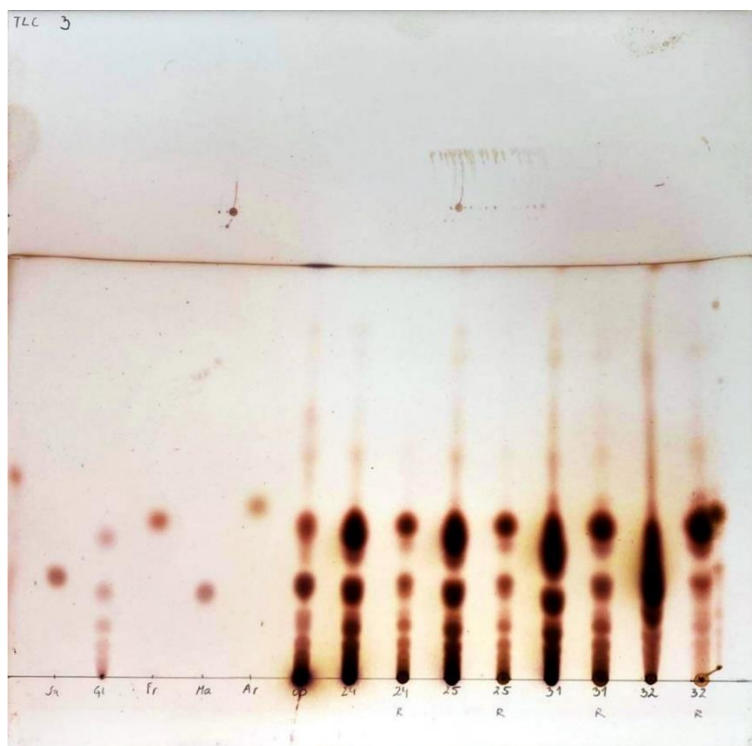


Slika 31: TLC plošča s standardi, vzorcem svežega česna (00) in naslednjimi petimi vzorci (13, 13 R, 14, 14 R, 21, 22, 23, 23 R)

Legenda:

Tabela 12: pozicije vzorcev na plošči TLC 2

Pozicija na plošči	Kratica	Celotno ime
1	Su	saharoza
2	Gl	glukozni sirup
3	Fr	fruktoza
4	Ma	maltoza
5	Ar	arabinoza
6	00	vzorec 00
7	13	vzorec 13
8	13 R	vzorec 13 redčen
9	14	vzorec 14
10	14 R	vzorec 14 redčen
11	21	vzorec 21
12	22	vzorec 22
13	23	vzorec 23
14	23 R	vzorec 23 redčen



Slika 32: TLC plošča s standardi, vzorcem svežega česna (00) in vzorci 24, 24 R, 25, 25 R, 31, 31 R, 32, 32 R

Legenda:

Tabela 13: pozicije vzorcev na plošči TLC 3

Pozicija na plošči	Kratica	Celotno ime
1	Su	saharoza
2	Gl	glukozni sirup
3	Fr	fruktoza
4	Ma	maltoza
5	Ar	arabinoza
6	00	vzorec 00
7	24	vzorec 24
8	24 R	vzorec 24 redčen
9	25	vzorec 25
10	25 R	vzorec 25 redčen
11	31	vzorec 31
12	31 R	vzorec 31 redčen
13	32	vzorec 32
14	32 R	vzorec 32 redčen

S primerjavo lis v vzorcu česna (oznaka 00) in ostalih vzorcih črnega česna smo dokazali, da se prisotnost sladkorjev ne spremeni, spremeni se zgolj njihova koncentracija. To je razvidno iz intenzitete lis pri dlje časa staranih vzorcih. Za lažjo razpoznavo sladkorjev

smo nekatere vzorce redčili. Najvišja lisa pri naših ekstraktih predstavlja fruktozo, tik pod njo pa je v nekaterih ekstraktih vidna tudi lisa glukoze. Prisotnost glukoze in fruktoze v česnu prikazuje tudi literatura (Yuan, Sun, Chen, & Wang, Journal of FOOD SCIENCE, 2016). Nižja lisa, ki je vidno intenzivnejša od ostalih, pa predstavlja maltozo, ki je prisotna v vseh vzorcih.

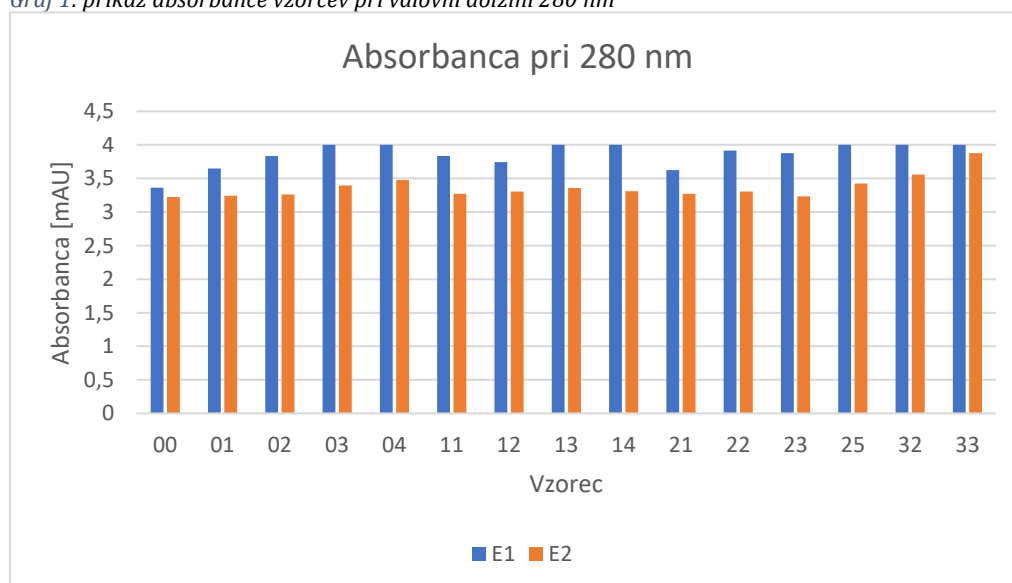
4.2 UV-VIS SPEKTROSKOPIJA

4.2.1 MELANOIDINI

Pri vseh treh valovnih dolžinah opazimo višanje absorbance v odvisnosti od časa. To prikazujejo spodnji grafi, označeni z 2, 3, 5, 6, 8, 9. Iz grafov 1, 4 in 7 opazimo tudi, da ima najnižjo absorbanco navadni česen, saj v njem ni potekla Maillardova reakcija, zato je prisotnost melanoidinov zanemarljiva. S tem so dokazali, da so v črnem česnu res prisotni melanoidini, ki česnu zaradi značilne barve povišajo absorbanco, in da pri segrevanju česna poteče Maillardova reakcija. Absorbanca redčitvene vrste E2 je nižja od absorbance redčitvene vrste E1, saj so E2 vzorci bolj redčeni in imajo zato manj intenzivno rjavo barvo. Pri temperaturah 70, 80 in 90 °C smo zaznali odstopanja nekaterih vrednosti, kar smo povezali z manj ustreznimi pogoji obdelave česna in morebitna nenatančnost med izvajanjem metode. Vsi grafi prikazujejo meritve materiala, kakršnega smo v poskusu pripravili, torej brez upoštevanja redčitev itd. Zato grafi ne prikazujejo dejanskih razmerij med vsebnostjo melanoidinov.

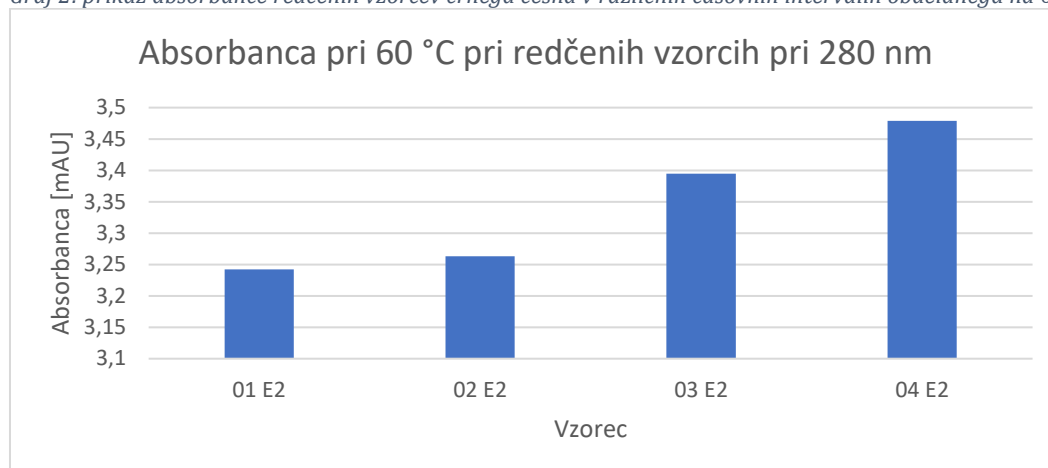
4.2.1.1 ABSORBANCA PRI 280 nm

Graf 1: prikaz absorbance vzorcev pri valovni dolžini 280 nm



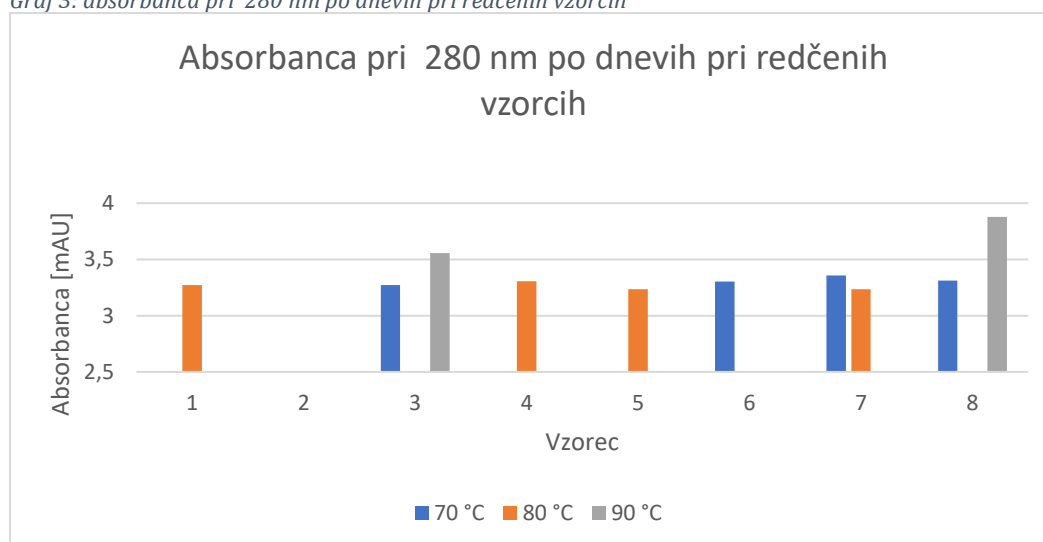
4.2.1.2 ABSORBANCA PRI 60 °C PRI 280 nm

Graf 2: prikaz absorbanca redčenih vzorcev črnega česna v različnih časovnih intervalih obdelanega na 60 °C pri 280



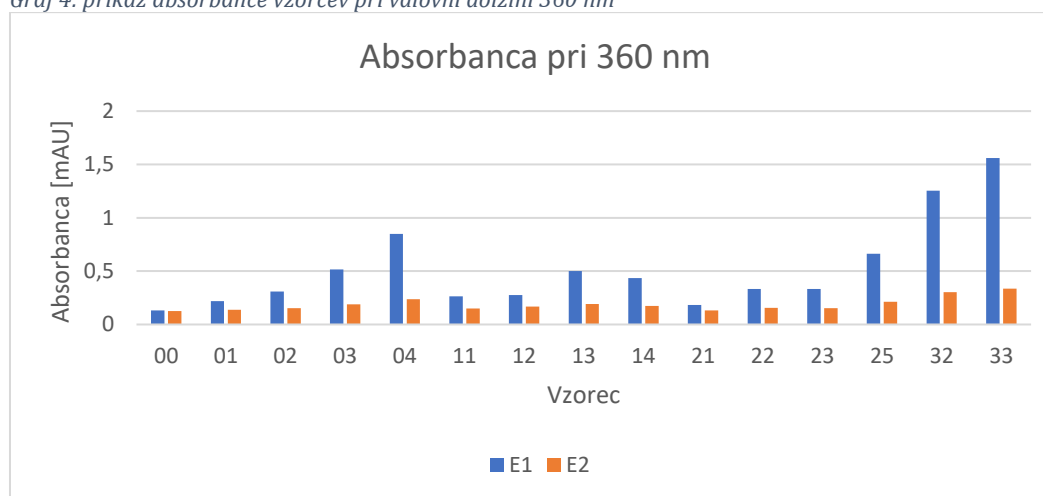
4.2.1.3 ABSORBANCA PRI 70, 80, 90°C PRI 280 nm

Graf 3: absorbanca pri 280 nm po dnevih pri redčenih vzorcih



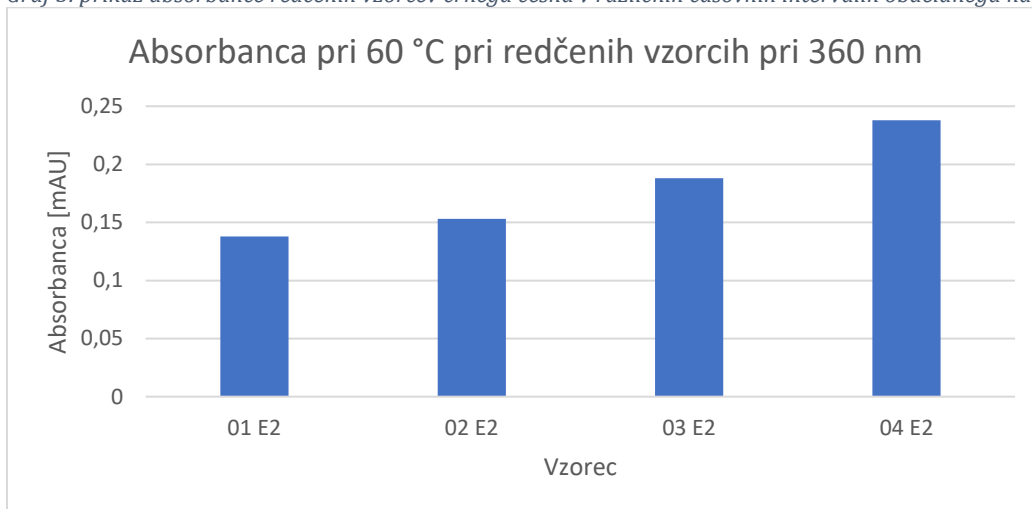
4.2.1.4 ABSORBANCA PRI 360 nm

Graf 4: prikaz absorbanca vzorcev pri valovni dolžini 360 nm



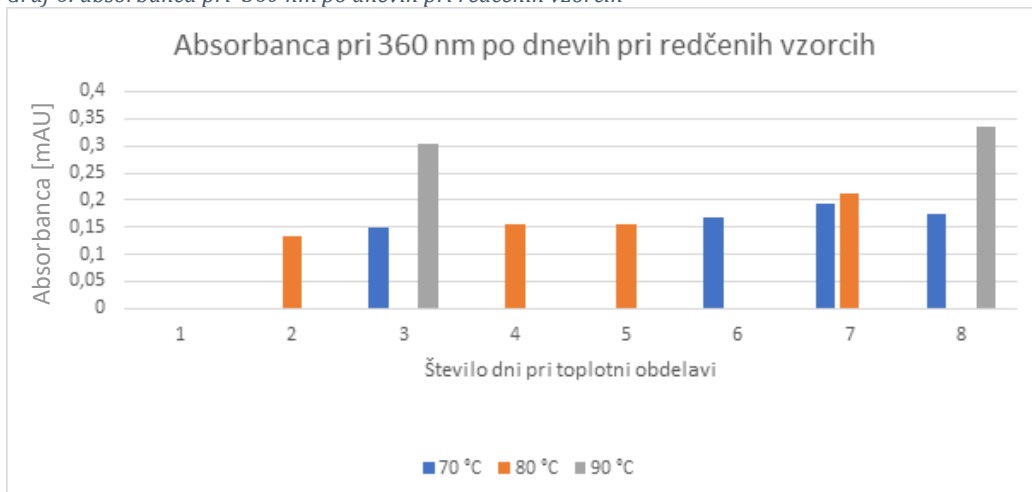
4.2.1.5 ABSORBANCA PRI 60 °C PRI 360 nm

Graf 5: prikaz absorbanca redčenih vzorcev črnega česna v različnih časovnih intervalih obdelanega na 60 °C pri 360 nm



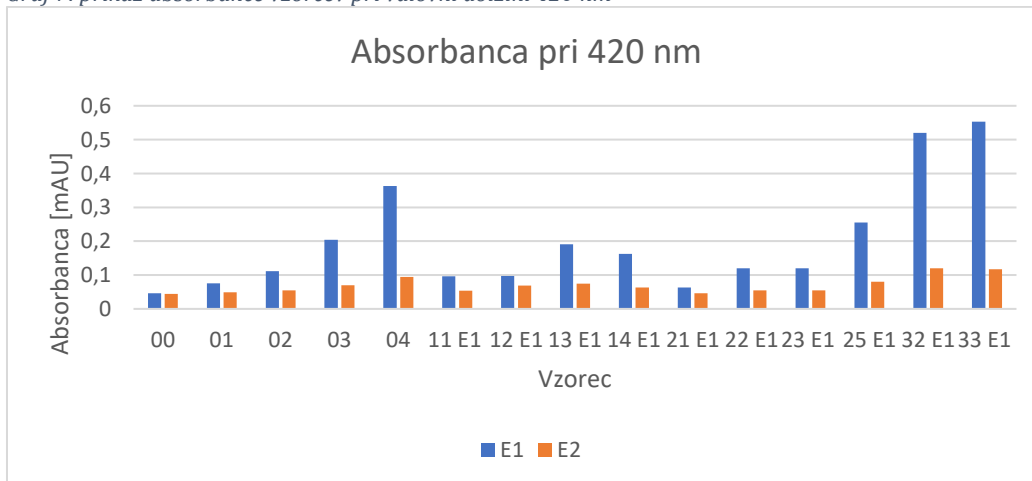
4.2.1.6 ABSORBANCA PRI 70, 80, 90°C PRI 360 nm

Graf 6: absorbanca pri 360 nm po dnevih pri redčenih vzorcih



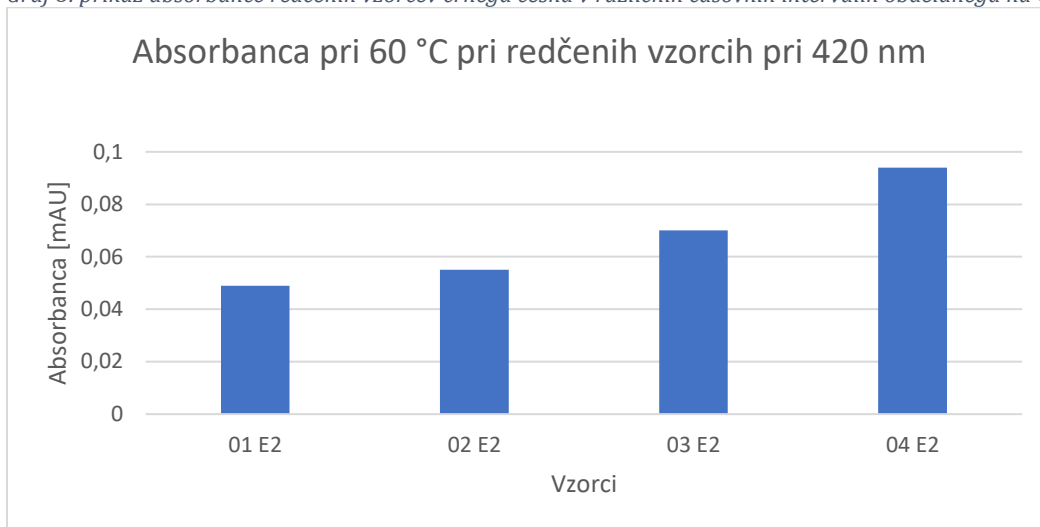
4.2.1.7 ABSORBANCA PRI 420 nm

Graf 7: prikaz absorbanca vzorcev pri valovni dolžini 420 nm



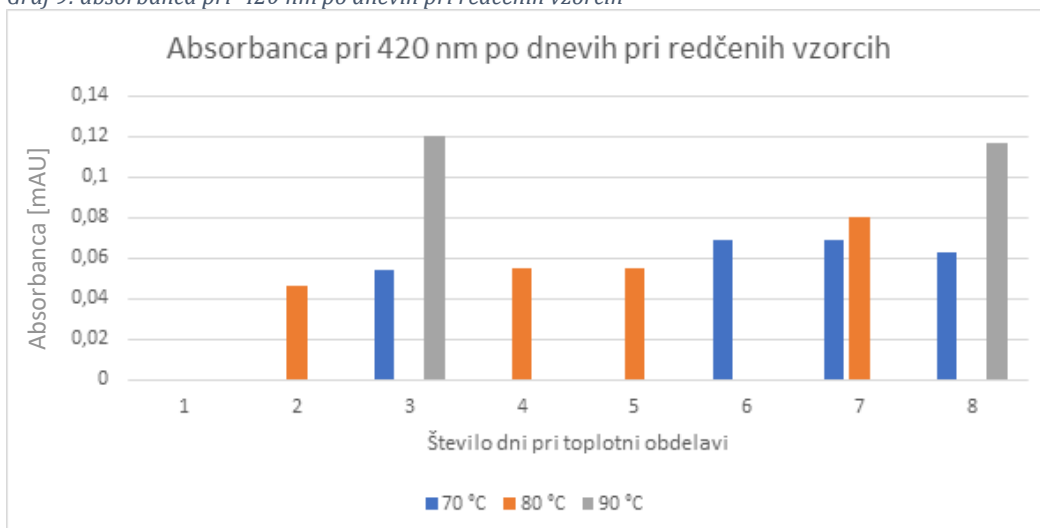
4.2.1.8 ABSORBANCA PRI 60 °C PRI 420 nm

Graf 8: prikaz absorbance redčenih vzorcev črnega česna v različnih časovnih intervalih obdelanega na 60 °C pri 420 nm



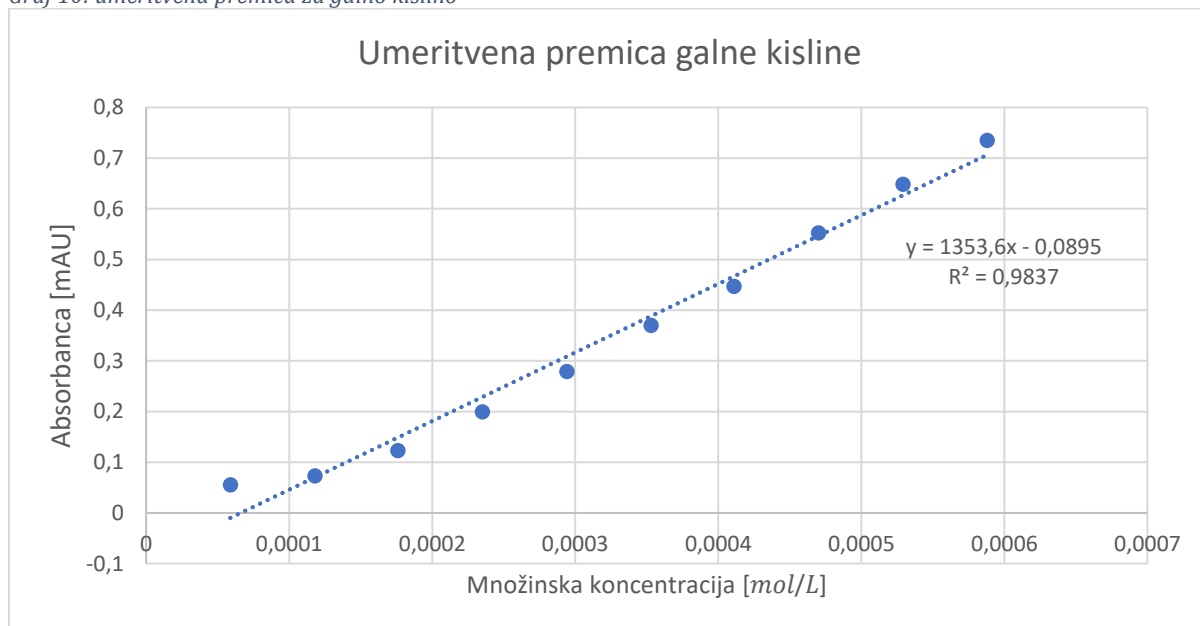
4.2.1.9 ABSORBANCA PRI 70, 80, 90 °C PRI 420 nm

Graf 9: absorbance pri 420 nm po dnevih pri redčenih vzorcih

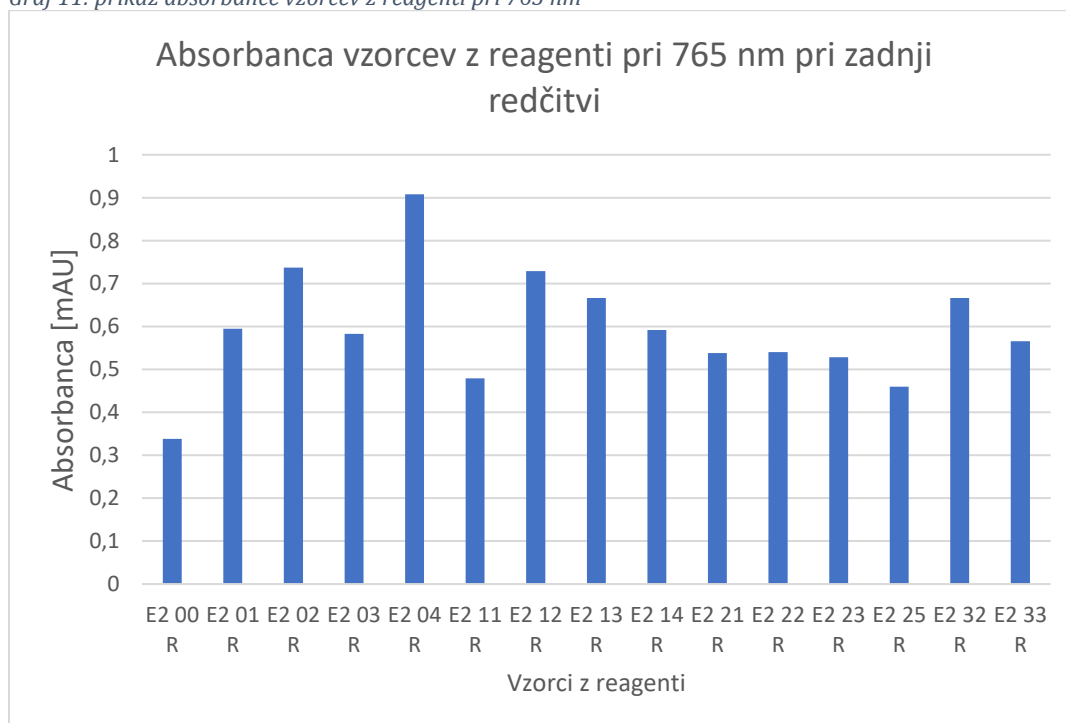


4.2.2 POLIFENOLI

Graf 10: umeritvena premica za galno kislino



Graf 11: prikaz absorbance vzorcev z reagenti pri 765 nm



S pomočjo umeritvene krivulje za galno kislino in absorbance redčenih vzorcev E2 smo izračunali koncentracije polifenolov v vsakem našem vzorcu po redčitvi, po enačbi:

$$c_k = \frac{A - n}{k}$$

Enačba 3: enačba za izračun koncentracije polifenolov po redčitvi

Pri tej c_k predstavlja koncentracijo polifenolov v vzorcu po redčitvi, n začetno vrednost umeritvene premice, k strmino umeritvene premice in A absorbanco vzorcev z odštetim ozadjem. Ozadje predstavlja absorbanca vode z reagenti in absorbanca posameznega vzorca brez reagentov. Zaradi redčenja smo morali za izračun koncentracije polifenolov v začetnem vzorcu uporabiti enačbo:

$$c_0 = c_k \cdot f$$

Enačba 4: enačba za izračun koncentracije v začetnem vzorcu

Pri tej c_0 predstavlja koncentracijo polifenolov v začetnem vzorcu, c_k koncentracijo polifenolov po redčitvi in f faktor redčitve.

Vsi izračuni so predstavljeni v tabeli 15.

Tabela 14: izračuni koncentracij polifenolov

Redčenje	Oznaka vzorca	Absorbanca + ozadje	Absorbanca – ozadje	Koncentracija polifenolov po redčitvi – c_k [mol/L]	Faktor f	Koncentracija polifenolov v začetnem vzorcu – c_0 [mol/L]
E2	00	0,3425	0,2515	$2,519 \cdot 10^{-4}$	20	0,005038
E2	01	0,5950	0,5020	$4,370 \cdot 10^{-4}$	20	0,008740
E2	02	0,7265	0,6335	$5,341 \cdot 10^{-4}$	20	0,010682
E3	03	0,5810	0,4900	$4,281 \cdot 10^{-4}$	40	0,017124
E3	04	0,9035	0,8105	$6,650 \cdot 10^{-4}$	40	0,026600
E3	11	0,4820	0,3920	$3,557 \cdot 10^{-4}$	40	0,014228
E2	12	0,7310	0,6410	$5,400 \cdot 10^{-4}$	20	0,010800
E3	13	0,6685	0,5775	$4,928 \cdot 10^{-4}$	40	0,019712
E3	14	0,5895	0,4965	$4,329 \cdot 10^{-4}$	40	0,017316
E2	21	0,5425	0,4525	$4,004 \cdot 10^{-4}$	20	0,008008
E3	22	0,5350	0,4420	$3,927 \cdot 10^{-4}$	40	0,015708
E3	23	0,5290	0,4390	$3,904 \cdot 10^{-4}$	40	0,015616
E4	25	0,4595	0,3675	$3,376 \cdot 10^{-4}$	100	0,033760
E4	32	0,6675	0,5735	$4,900 \cdot 10^{-4}$	100	0,049000
E4	33	0,5700	0,4780	$4,193 \cdot 10^{-4}$	100	0,041930

Iz dobljenih koncentracij c_0 smo izračunali, koliko polifenolov v miligramih se nahaja v enem gramu česna.

Najprej smo po spodnji enačbi izračunali, koliko mg vzorca je bilo v mL našega metanolnega ekstrakta:

$$\frac{\text{mg vzorca česna}}{\text{mL metanolnega ekstrakta}} = \frac{\text{masa dveh strokov česna}}{\text{volumen metanolnega ekstrakta}}$$

Enačba 5: enačba za izračun, koliko mg česna je v mL metanolnega ekstrakta

Nato smo iz množinskih koncentracij izračunali masne koncentracije polifenolov v naših ekstraktih. Enačba je napisana spodaj:

$$\gamma_o = c_o \cdot M$$

Enačba 6: enačba za izračun masne koncentracije

V enačbi γ_o predstavlja masno koncentracijo polifenolov v naših ekstraktih v gramih na liter, c_o množinsko koncentracijo polifenolov v ekstraktih in M molsko maso galne kisline.

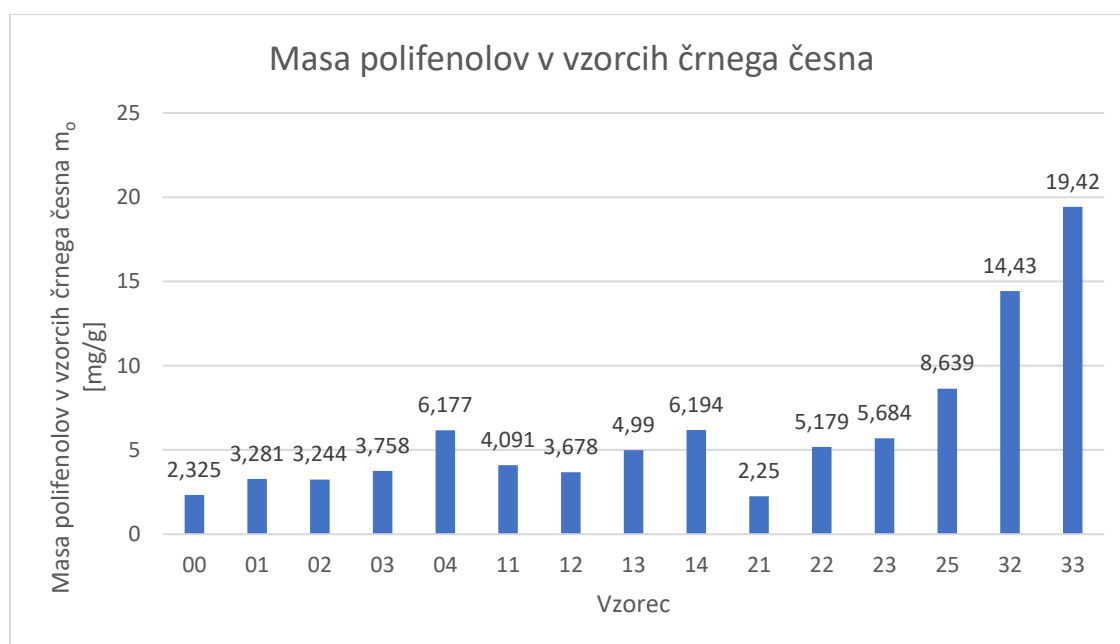
Dobljeno molsko maso smo delili z vsebnostjo česna v naših ekstraktih, ki smo jo pretvorili na grame in dobili vsebnost polifenolov v gramih na gram česna. Vrednost smo pomnožili s 1000, da smo dobili vrednost v miligramih. Enačba je zapisana spodaj:

$$m_o = \frac{\gamma_o}{\text{vsebnost česna v metanolnih ekstraktih}} \cdot 1000$$

Enačba 7: enačba za izračun mase polifenolov na gram česna

V enačbi m_o predstavlja maso polifenolov v miligramih na gram črnega česna, γ_o pa masno koncentracijo polifenolov v naših ekstraktih.

Graf 12: masa polifenolov v vzorcih črnega česna



Vsi izračuni so predstavljeni v tabeli 16:

Tabela 15: izračuni vsebnosti polifenolov v miligramih na gram česna

Vzorec	Vsebnost česna v metanolnih ekstraktih [mg/mL]	Masne koncentracije polifenolov - γ_0 [g/L]	Masa polifenolov v vzorcih črnega česna m_0 [mg/g]
00	184,3	0,4285	2,325
01	226,6	0,7434	3,281
02	280,1	0,9086	3,244
03	387,6	1,457	3,758
04	366,3	2,263	6,177
11	295,8	1,210	4,091
12	249,8	0,9186	3,678
13	336,0	1,677	4,990
14	237,8	1,473	6,194
21	302,6	0,6812	2,250
22	256,5	1,336	5,179
23	233,7	1,328	5,684
25	332,4	2,872	8,639
32	288,8	4,168	14,43
33	183,7	3,567	19,42

4.3 REZULTATI HPLC ANALIZE

Graf 13: kromatogram standarda 5-HMF

Data File C:\CHEM32\1\DATA\CESEN\CESEN2 2023-06-22 14-20-15\002-0201.D
 Sample Name: 5-HMF

```

=====
Acq. Operator   : Branka                      Seq. Line : 2
Acq. Instrument : Agilent HPLC                 Location  : Vial 2
Injection Date  : 6/22/2023 2:42:54 PM        Inj       : 1
                                                    Inj Volume: 1.000 µl

Method         : C:\CHEM32\1\DATA\CESEN\CESEN2 2023-06-22 14-20-15\CESEN_PIA_EVA.M (Sequence
Method)
Last changed   : 6/22/2023 2:07:58 PM by Branka
Method Info    : 5-HMF
    
```

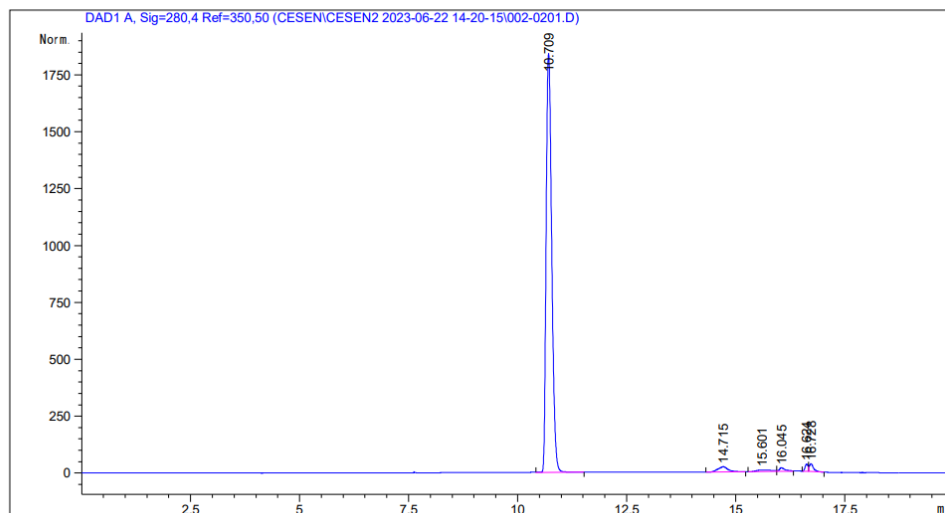
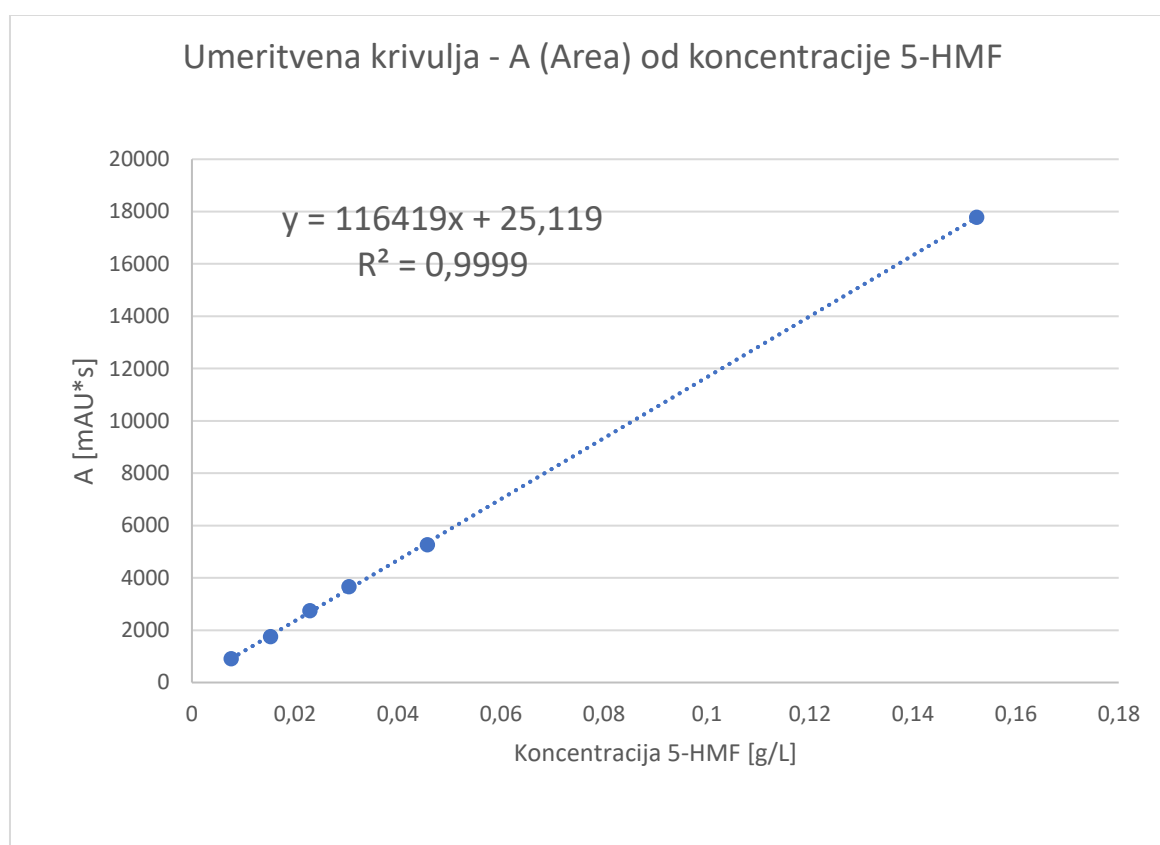


Tabela 16: izračun povprečnega retenzijskega časa pri posameznem standardu in površin pika pri povprečnem retenzijskem času

Oznaka raztopin standarda	Masna koncentracija [g/L]	Povprečni retenzijski čas [min]	Area [mAU * s]
S ₁	0,15240	10,97	17774,32
S ₂	0,04572	10,82	5257,028
S ₃	0,03048	10,23	3658,392
S ₄	0,02286	10,70	2745,657
S ₅	0,01524	10,69	1749,786
S ₆	0,00762	10,71	901,7111

$t_r(5\text{-HMF})_{\text{povp}} = 10,69 \text{ min}$... povprečni retenzijski čas

Graf 14: umeritvena krivulja A (Area) od koncentracije 5-HMF

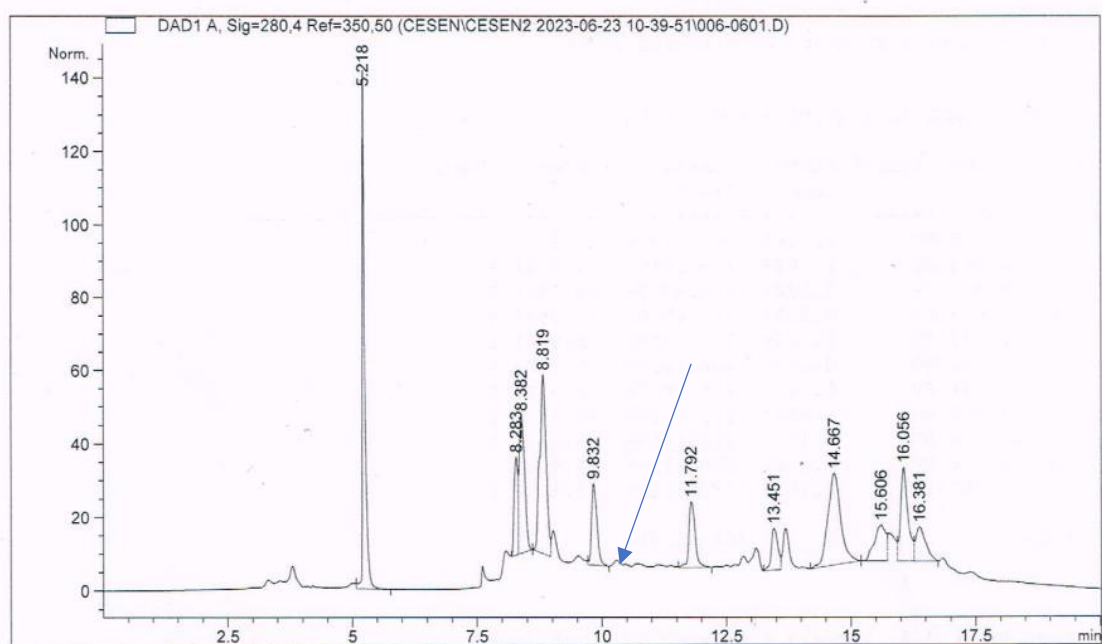


Po analizi kromatogramov česna (01, 02, 03, 04) je opaziti kromatografski vrh pri retenzijskem času (10,7 min), ki pripada 5-hidroksimetil furfuralu. Opazimo, da se vsebnost spreminja in je odvisna od pogojev, v katerih smo pripravili naše vzorce.

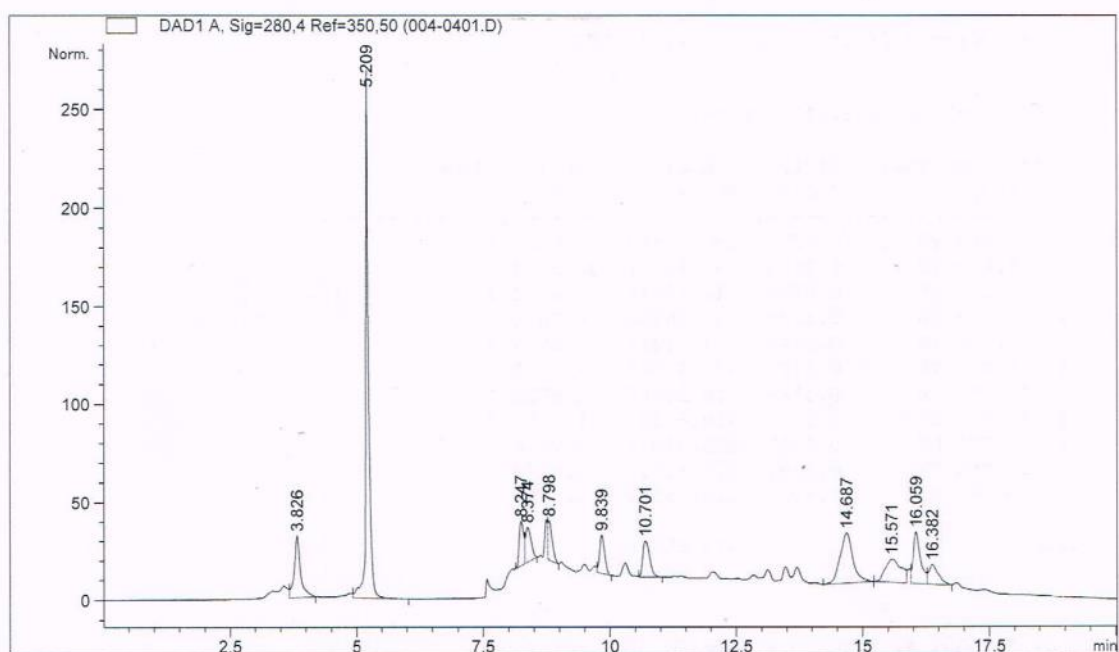
Praviloma je na vseh kromatogramih zaznati naraščanje površin dveh pikov ob času 5,2 min in 10,7 min. Za pik ob retenzijskem času 10,7 min lahko z gotovostjo trdimo, da pripada 5-hidroksimetilfurfuralu.

Na kromatogramu vzorca česna, ki je bil pripravljen iz svežega vzorca, ni zaznati kromatografskega vrha ob času 10,7 min.

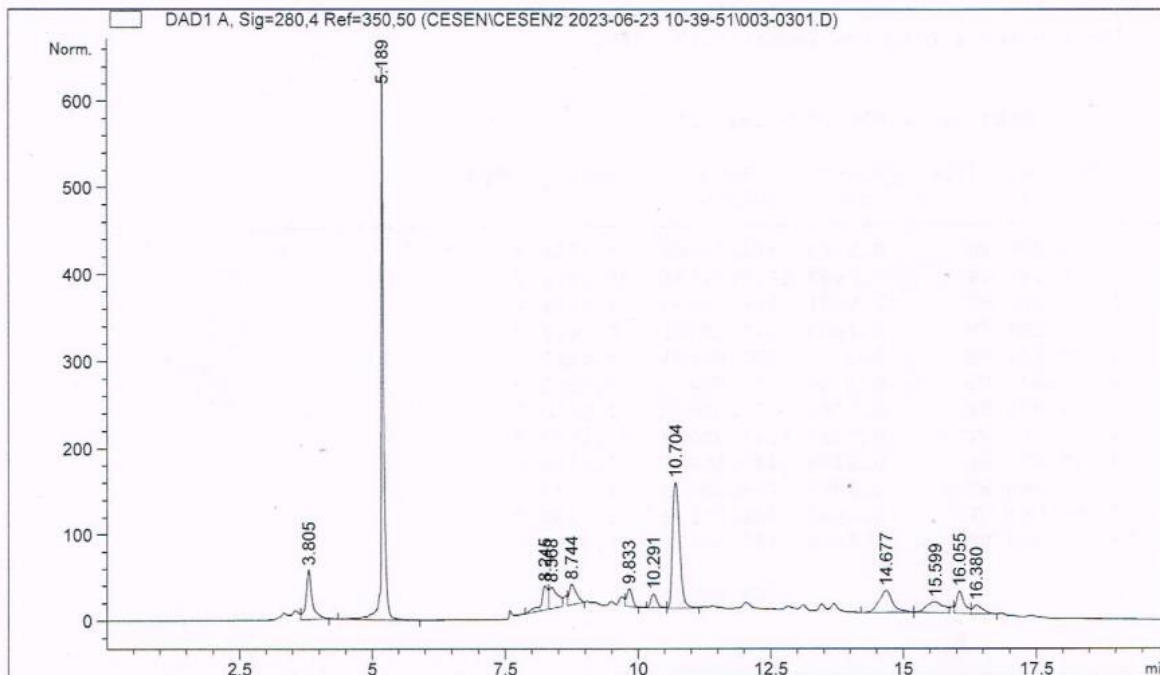
Graf 15: kromatogram vzorca 01



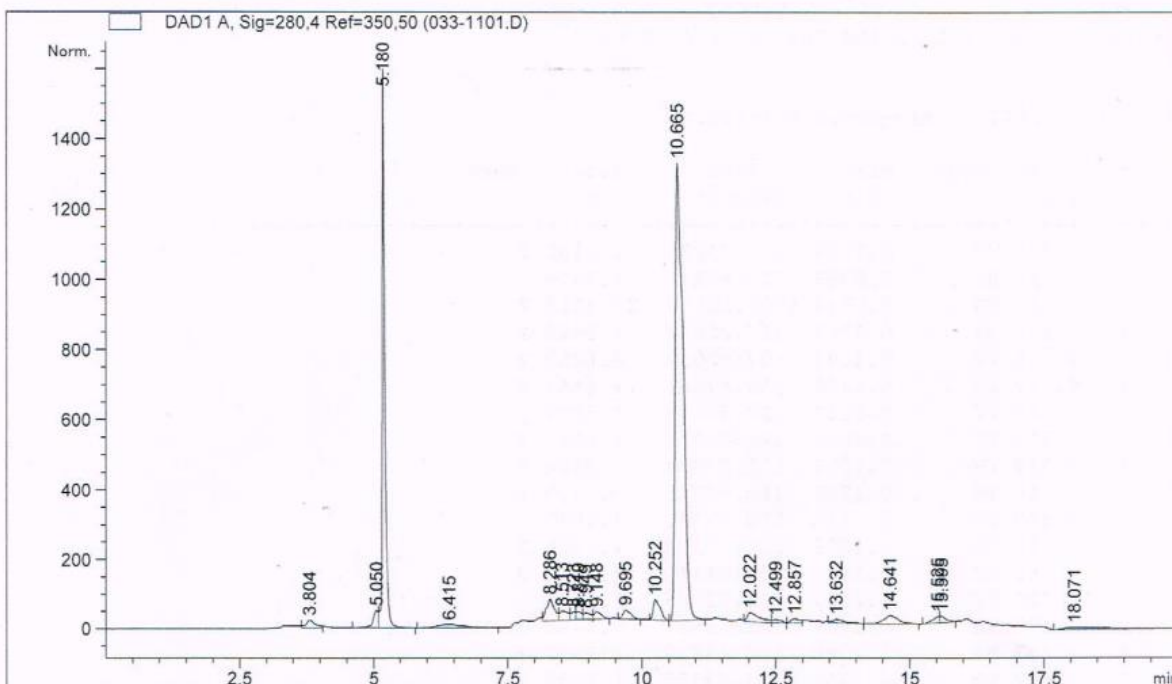
Graf 16: kromatogram vzorca 02



Graf 17: kromatogram vzorca 03

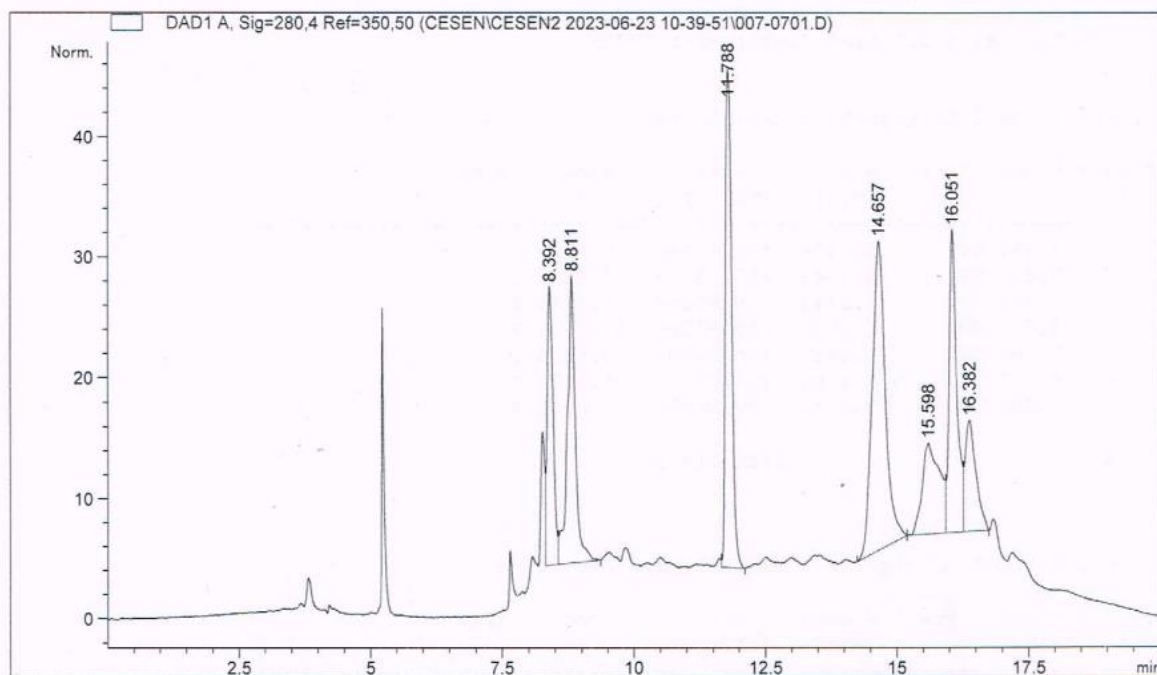


Graf 18: kromatogram vzorca 04



Na kromatogramu vzorca česna, ki je bil pripravljen iz svežega vzorca, ni zaznati kromatografskega vrha ob času 10,7 min.

Graf 19: kromatogram vzorca 00



V tabeli 18 so zbrane površine pikov ob času 10,70 min. S pomočjo umeritvene krivulje smo izračunali masno koncentracijo 5-HMF v metanolnem ekstraktu liofiliziranega česna.

Enačba umeritvene krivulje:

$$A = 116419 \cdot \gamma + 25,119$$

A ... Area [mAU*s] ...površina pika

γ ... Masna koncentracija 5-HMF [g/L]

Enačba 8: enačba umeritvene krivulje 5-HMF

Tabela 17: ocena vsebnosti 5-HMF

Oznaka vzorca	Area [mAU * s]	Masna koncentracija [g/L]	Masa liofiliziranega česna [g]	Volumen ekstrakta [L]	Ocena vsebnosti 5-HMF mg/g liofiliziranega česna
00	Ni vrha	/	2,260	0,01226	/
01	156,07	0,001124825	2,930	0,01293	$4,964 \cdot 10^{-3}$
02	286,07	0,002241481	3,890	0,01389	$8,002 \cdot 10^{-3}$
03	1377,56	0,011617013	6,330	0,01633	$2,997 \cdot 10^{-2}$
04	11548,2	0,098979385	5,780	0,01578	$2,702 \cdot 10^{-1}$
11	Ni vrha	/	4,200	0,01420	/
12	Ni vrha	/	3,330	0,01333	/
13	170,14	0,001245682	5,060	0,01506	$3,707 \cdot 10^{-3}$
14	290,15	0,002276527	3,120	0,01312	$9,573 \cdot 10^{-3}$
21	Ni vrha	/	4,340	0,01434	/
22	Ni vrha	/	3,450	0,01345	/
23	130,67	0,000906648	3,050	0,01305	$3,880 \cdot 10^{-3}$
25	180,145	0,001331621	4,980	0,01498	$4,006 \cdot 10^{-3}$
32	660,432	0,005457125	4,060	0,01406	$1,900 \cdot 10^{-2}$
33	13548,2	0,116158711	2,250	0,01225	$6,323 \cdot 10^{-1}$

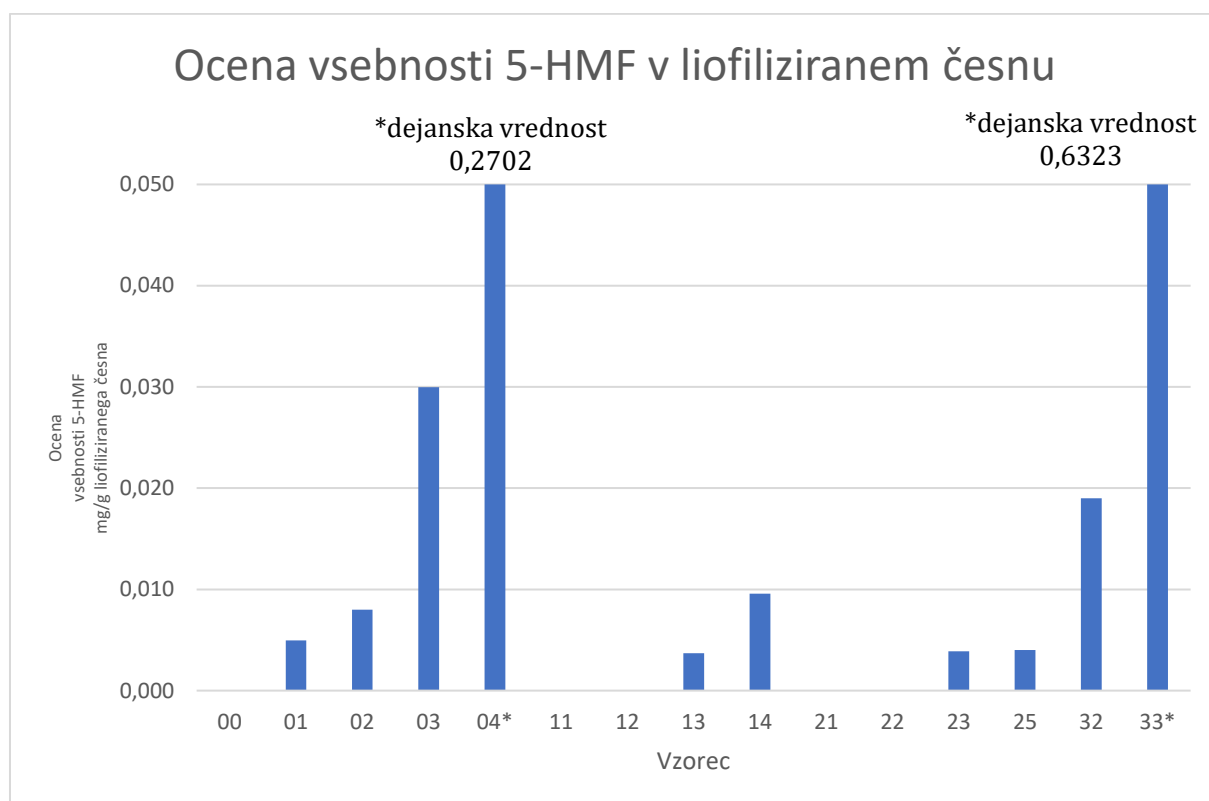
Količino 5-HMF, ki je nastal v procesu priprave črnega česna, smo izrazili na 1 g liofiliziranega česna.

$m(5\text{-HMF}) = \gamma \cdot V(\text{ekstrakta})$ V ... volumen ekstrakta (naveden v zgornji tabeli)

$$\frac{m(5 - \text{HMF})}{m(\text{liofiliziranega česna})} = \frac{\gamma \cdot V(\text{ekstrakta})}{m(\text{liofiliziranega česna})}$$

Enačba 9: izračun količine 5-HMF

Graf 20: ocena vsebnosti 5-HMF liofiliziranega česna



5 RAZPRAVA

V raziskovalni nalogi smo pripravili več serij črnega česna pri različnih temperaturah in z različnim trajanjem inkubacije. Glede na to, da so postopki priprave črnega česna znani in obširno opisani v strokovni literaturi, smo se osredotočili predvsem na spremembe, ki se med procesom dogajajo z nekaterimi sestavinami česna, kot so ogljikovi hidrati, polifenoli, melanoidini ter ostali produkti Maillardove reakcije. Poskuse smo pripravili tako, da količina česna v samih poskusih ni imela pomembne vloge, saj so bili pogoji inkubacije primerljivi s pogoji v večjem proizvodnem merilu. Ključna procesna parametra sta bila namreč temperatura in vlažnost, ki smo ju vzdrževali v določenih in kontroliranih mejah.

Česen smo vzorčili med procesom v različnih intervalih, ki so bili pri vzorcih, inkubiranih pri 90 °C, pogostejši, ker je bila tudi dinamika sprememb materiala veliko hitrejša kot pri na primer 60 °C.

Izkaže se, da so najoptimalnejši pogoji priprave črnega česna pri relativni vlažnosti 90 % in temperaturi 60 °C, kar smo razbrali tudi iz preučene literature (Aoudeh, in drugi, 2023). S tem smo potrdili svojo prvo hipotezo: »**Ključni procesni parametri priprave črnega**

česna v laboratorijskem merilu so ustrezni ter primerljivi s procesnimi parametri priprave črnega česna v večjem merilu.«

Glavni izzivi so se pojavili pri pripravi vzorcev za kvalitativne in kvantitativne analize materiala. Struktura materiala se je namreč med posameznimi serijami črnega česna na račun različne priprave (višje/nizje temperature, krajše/daljše trajanje inkubacije) zelo razlikovala. Najbolj kremasto strukturo so imeli vzorci ob koncu inkubacije (60 °C, 70 °C, 80 °C in 90 °C); te smo homogenizirali najlažje in delež delcev večjih od 1 mm je bil zelo nizek.

Po drugi strani smo imeli več dela z vzorci, ki smo jih inkubirali manj časa oziroma pri nižjih temperaturah. Pri teh vzorcih je bil po homogeniziranju delež delcev, večjih od 1 mm, večji.

Ker so bile količine vzorcev relativno majhne, jih nismo mogli homogenizirati v mlinu ali s pomočjo ultrazvoka, kar bomo v prihodnjih poskusih upoštevali ter v osnovi pripravili desetkrat večje količine česna.

Kljub razlikam v strukturi homogenizatov smo na osnovi rezultatov ugotovili, da je bila učinkovitost ekstrakcije vzorcev primerna. Le-to smo sicer pričakovali, ker smo ekstrakcijo izvajali s pomočjo ultrazvoka v ultrazvočni kopeli približno 30 minut.

Zaradi relativno majhnih alikvotov vzorčenega materiala (česna) smo opazili, da bi lahko bili nekateri vzorci, ki smo jih odvzeli med procesom za kontrolo procesa, nereprezentativni. Že v samih glavicah smo namreč opazili morfološko različne stroke. Česen smo vzorčili čim bolj reprezentativno, kar pomeni, da so bili vzorci glede na velikost in število strokov med seboj primerljivi, vendar pa to v dveh primerih, pri vzorcih 23 in 31, ni bilo izvedljivo.

V naslednjih poskusih bodo zaradi večje količine materiala vzorci vsekakor reprezentativni.

Ko smo poskusili česen, ki je bil iz sušilnika vzet po nekaj dneh in ni bil izrazito črne barve, smo začutili rahlo grenek okus. Česen, ki je bil vzet iz sušilnika kasneje, je bil temnejši in čedalje slajši. S tankoplastno kromatografijo smo s primerjavo s standardi kvalitativno dokazali, da pri inkubaciji česna sestavljeni ogljikovi hidrati (maltoza, saharoza, polisaharidi) hidrolizirajo do monosaharidov. Pri vseh vzorcih črnega česna je zaznati

intenzivnejše lise na kromatogramu, ki smo jih identificirali kot glukozo in fruktozo, in manj izrazite lise, ki smo jih identificirali za maltozo, saharozo in polisaharide. V svežem in črnem česnu so prisotni enaki sladkorji, vendar so bile lise, ki pripadajo monosaharidom intenzivnejše pri temnejših vzorcih. Naš sveži česen pa je pred obdelavo že kalil, torej je imel že od začetka manj škroba, kot bi ga imel česen pred kalitvijo, vendar so bile razlike v lisah še vedno opazne. Iz tega sklepamo, da so koncentracije enostavnih sladkorjev v črnem česnu višje kot v svežem česnu, kar je opisano tudi v literaturi (Yuan, Sun, Chen, & Wang, The Comparison of the Contents of Sugar, Amadori, and Heyns Compounds in Fresh and Black Garlic, 2016).

Ker so melanoidini ključni za črno barvo česna, smo sklepali, da čas inkubacije vpliva na vsebnost le-teh. Iz literature (National Library of Medicine, 2016) je razbrati, da ima dlje staran česen večjo vsebnost melanoidinov. Količino le-teh smo spremljali z UV-VIS spektrofotometrijo. Temnejši, kot je česen, višjo absorbanco ima, kar lahko povežemo s tem, da ima višjo absorbanco česen, ki vsebuje več melanoidinov, saj dajejo melanoidini česnu temno barvo. Kot prikazujejo naši grafi (poglavje 4.2.1), ima dlje staran česen res višje absorbance, torej večjo vsebnost melanoidinov. Za analizo smo upoštevali grafe česna pri 60 °C, saj je to optimalna temperatura za nastanek črnega česna. Ti grafi so bili najlažji za interpretacijo, saj niso vsebovali nobenih odstopanj.

Vsebnosti polifenolov smo določili s pomočjo UV-VIS spektrofotometrije. Iz izračunanih vrednosti, zapisanih v tabeli 16, je razbrati rast količine polifenolov na gram črnega česna, kar je zaznati tudi v literaturi (Kim, Kang, & Gweon, 2013).

Pri HPLC analizi vseh vzorcev, ne glede na pogoje staranja, se izkazuje naraščanje koncentracije 5-HMF, kar je opisano tudi v literaturi. Iz grafa 20 je razvidna rast količine 5-hidroksimetilfurfurala v odvisnosti od časa inkubacije. Vzorca 04 in 33 po vsebnosti 5-HMF zelo odstopata od ostalih vzorcev in na grafu niso predstavljene njune dejanske vsebnosti te spojine. Vzorec 04 namreč vsebuje 0,2702 mg 5-HMF na gram liofiliziranega česna, vzorec 33 pa 0,6323 mg 5-HMF na gram liofiliziranega česna. Iz literature (Delgado-Andrade, Rufian, & Morales, 2009) razberemo, da 5-hidroksimetilmurfural sam po sebi ni toksičen, vendar se lahko pri posebnih pogojih pretvori v 5-sulfoksimetilfurfural, ki je kancerogen. Na podlagi pridobljenih podatkov sklepamo, da je inkubiranje česna smiselno le do neke mere, saj lahko drugače pride do prevelikih količin komponent, ki so potencialno škodljive zdravju.

Z rezultati analiz lahko potrdimo našo drugo hipotezo: **»S svojimi poskusi priprave česna lahko dosežemo primerljive rezultate z rezultati iz literature, in sicer glede koncentracije sladkorjev, vsebnosti melanoidinov, polifenolov in 5-hidroksimetilfurfurala.«**

Z rezultati analiz lahko potrdimo tudi našo tretjo hipotezo: **»S svojimi analiznimi postopki bomo dobili rezultate, ki bodo osnova za določitev parametrov procesa priprave črnega česna, konkretno temperature in trajanja, tudi z ozirom na specifičnost česna, ki smo ga uporabile v svojih poskusih.«**

6 ZAKLJUČEK

Med našo raziskovalno nalogo smo se naučili veliko o laboratorijskih tehnikah in metodah, ki se uporabljajo pri delu z organskim materialom.

Izpolnili smo naslednje cilje, ki smo si jih zadali pred začetkom raziskovalnega dela. Preučili smo črni česen, njegovo sestavo in nastanek, ter ga primerjali s svežim česnom. Prav tako smo preučili in analizirali produkte Maillardove reakcije, ki poteče pri procesu staranja česna. S pomočjo literature smo našli najoptimalnejše pogoje za predelavo svežega česna v črnega in jih pri samem postopku tudi uporabili. Spoznali in preizkusili smo veliko metod, ki jih lahko uporabimo za preučevanje organskega materiala. Kvalitativno smo med seboj primerjali po videzu različne vzorce črnega česna. Sestavo vzorcev svežega in črnega česna smo tako kvalitativno kot tudi kvantitativno primerjali z ustreznimi izbranimi metodami, in sicer s tankoplastno kromatografijo, UV-VIS spektrofotometrijo in HPLC metodo.

Z dobljenimi rezultati smo potrdili naše hipoteze. Glede na rezultate analiz lahko z gotovostjo trdimo, da so najoptimalnejši pogoji priprave črnega česna pri relativni vlažnosti 90 % in temperaturi 60 °C.

Pri tekočinski kromatografiji visoke ločljivosti smo poleg vrha 5-HMF zasledili vrh še ene komponente črnega česna, ki je prisoten pri vseh vzorcih ob retenzijskem času 5,2 min. Zaznati je oster in pravilen kromatografski vrh, ki izkazuje naraščanje koncentracije snovi v odvisnosti od časa staranja česna. V nadaljnjih raziskavah bi bilo smotrno preučiti, katera snov daje ta vrh na kromatogramu.

7 VIRI

7.1 BIBLIOGRAFIJA

- A. Vogel. (2024). *A. Vogel Enciklopedija rastlin*. Pridobljeno 31. avgust 2023 iz <https://www.avogel.si/enciklopedija-rastlin/cesen.php>
- Abbas, M., Saeed, F., Anjum, F. M., Afzaal, M., Tufail, T., Bashir, M. S., . . . Suleria, H. A. (2017). Natural polyphenols: An overview. *International Journal of Food Properties*, 1689–1699.
- Ahmed, R. (2018). Hepatoprotective and antiapoptotic role of aged black garlic against hepatotoxicity induced by cyclophosphamide. *The Journal of Basic and Applied Zoology*.
- Ahmed, T., & Wang, C.-K. (2021). Black Garlic and Its Bioactive Compounds on Human Health Diseases: A Review. *Molecules*.
- Anzelc, T. (2006). Fizikalne lastnosti arheosomov pripravljenih lipidov hipertermofilne arheje . Ljubljana.
- Aoudeh, E., Oz, E., Kelebek, H., Brennan, C., Ahmad, N., Elobeid, T., & Oz, F. (14. april 2023). Black garlic production: The influence of ageing temperature and duration on some physicochemical and antioxidant properties, and sugar content.
- Azwanida, N. (2015).) A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Med Aromat Plants*.
- Bajec, P., & Tori, T. (junij 2014). Pridobljeno 6. september 2023 iz https://moodle.gimnm.si/pluginfile.php/11861/mod_resource/content/3/Kurkuma%20-%20Izolacija%20%20identifikacija%20in%20presku%C5%A1anje%20njenih%20zdravilnih%20u%C4%8Dinkovin
- Bartulović, R., Turković Feher, L., & Čuić Mojsović, A. (2022). Oksidacijski i antimikrobni učinci alicina. *Journal of Applied Health Sciences*.
- Bayan, L., Hossain Koulivand, P., & Gorji, A. (februar 2014). Garlic: a review of potential therapeutic effects. Združene države Amerike .
- Bele, A. A., & Khale, A. (18. Januar 2010). International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research . *An overview on thin layer chromatography* , str. 256-267.
- Bionity. (brez datuma). Pridobljeno iz spletno mesto Bionity: <https://www.bionity.com/en/encyclopedia/Garlic.html>
- Bruttini, R., & Liapis I., A. (1995). *Handbook of Industrial Drying*. CRC Press.

- Charron, C., Milner, J., & Novotny, J. (2016). Garlic. *Encyclopedia of Food and Health*, 184–190.
- Cheng, K.-C., Kimura, S., Lai, Y.-J., Pan, M.-H., Su, N.-W., & Tung, Y.-C. (januar 2017). Journal of food and drug analysis. *Black garlic: A critical review of its production, bioactivity, and application*, str. 62–70.
- Combs Jr., G. F., & McClung, J. P. (2016). *The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health*. Academic Press.
- Delgado-Andrade, C., Rufian, H. J., & Morales, F. J. (2009). Hydroxymethylfurfural in commercial biscuits marketed in Spain. *Journal of Food and Nutrition Research*, Vol. 48, str. 14–19.
- Delo. (6. januar 2016). Črni česen za k srni al tuni pa tudi za v sladoled. Pridobljeno iz <https://old.delo.si/prosti-cas/kulinarika/crni-cesen-za-k-srni-ali-tuni-pa-tudi-za-v-sladoled.html>
- Dong, M. W. (2006). *Modern HPLC for practicing scientists*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Fabián, S. Q., Sahagún, D. O., Carrera, M. V., & Roa, R. I. (2013). Alliin, a garlic (*Allium sativum*) compound, prevents LPS-induced inflammation in 3T3-L1 adipocytes. *Mediators of inflammation*.
- Fakulteta za farmacijo. (2010). Kromatografija. Ljubljana.
- Fakulteta za farmacijo. (2024). Kromatografija. Ljubljana.
- Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo. (28. marec 2013). Separiranje organskih analitov. Ljubljana, Ljubljana, Slovenija.
- Godec, G., Grubelnik, L., Glažar, S., Jamšek, S., & Zmazek, B. (2015). Naravoslovje 7. Ljubljana: Zavod RS za šolstvo.
- Gojkošek, M. (2012). ANALIZA UPORABE VITAMINOV IN VITAMINSKIH DOPOLNIL. Koper: Univerza na Primorskem, Fakulteta za management.
- Gregorič, N. (2009). *University of Nova Gorica*. Pridobljeno iz Spektrofotometrično določanje barve rdečih primorskih vin: <http://www.ung.si/~library/diplome/VINARSTVO/1Gregoric.pdf>
- Grmek, D. (2011). Razvoj HPLC metode za določanje nečistost v zdravilni učinkovini. Maribor, Maribor, Slovenija.
- Gurman.eu. (27. maj 2015). Pridobljeno 4. september 2023 iz <https://www.gurman.eu/leksikon/kemija-v-prehrani/maillardova-reakcija>

- Ha, A. W., Ying, T., & Kim, W. K. (2015). The effects of black garlic (*Allium sativum*) extracts on lipid metabolism in rats fed a high fat diet. *Nutrition research and practice*, 30–36.
- Iciek, M., Kwiecień, I., & Włodek, L. (27. februar 2009). Environmental and molecular mutagenesis. *Biological properties of garlic and garlic-derived organosulfur compounds*, str. 247–265.
- ISO (the International Organization for Standardization). (2005). Determination of substances characteristic of green and black tea.
- JOVCHEVSKA, M. (22. junij 2022). *Univerza v Ljubljani*. Pridobljeno 1. september 2023 iz <https://repositorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=157538&lang=slv>
- Kang, O. J. (december 2016). Preventive nutrition and food science. *Evaluation of Melanoidins Formed from Black Garlic after Different Thermal Processing Steps*, str. 398–405.
- Kastelic Švab, M. (Ljubljana 2016). *DIGITALNA KNJIŽNICA BIOTEHNIŠKE FAKULTETE, Zbirka diplomskih, magistrskih in doktorskih del s polnim tekstom*. Pridobljeno 4. september 2023 iz http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/zivilstvo/md_kastelic_svab_marjetka.pdf
- Kim, J.-S., Kang, O.-J., & Gweon, O.-C. (2013). Comparison of phenolic acids and flavonoids in black garlic at different thermal processing steps.
- Kočevar, M. (2024). *Bodi eko*. Pridobljeno 31. avgust 2023 iz <https://www.bodieko.si/cesen-za-dobro-zdravje>
- Korošec, Ž. (brez datuma). *Inštitut za nutricionistiko*. Pridobljeno 3. september 2023 iz <https://www.nutris.org/prehrana/abc-prehrane/vitamini/190-vitamin-a.html>
- Krznar, D. (2010). Protimikrobno delovanje enostavnih fenolnih spojin ter ekstraktov rožmarina in žajblja na različne vrste bakterij . Ljubljana.
- Lanzotti. (april 2006). Volume 1112. *The analysis of onion and garlic*, str. 3–22.
- Li, L., Sun, T., Tian, J., Yang, K., Yi, K., & Zhang, P. (2013). Garlic in Clinical Practice: An Evidence-Based Overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 670–681.
- MasterClass. (19. september 2022). *MasterClass*. Pridobljeno 3. september 2023 iz spletno mesto MasterClass: <https://www.masterclass.com/articles/all-about-garlic-benefits-and-uses-plus-easy-roasted-garlic-recipe>
- Mlinar, M. (2019). *Visoka šola za varstvo okolja*. Pridobljeno 10. januar 2023 iz <http://www.vsvo.si/wp-content/uploads/2020/01/DN.pdf>

- Nakagawa, K., Maeda, H., Yamaya, Y., & Tonosaki, Y. (7. oktober 2020). *Molecules. Maillard Reaction Intermediates And Related Phytochemical in Black Garlic Determined by EPR and HPLC analyses.*
- Nath Gupta, M., & Roy, I. (23. December 2010). *Biotechnology and Applied Biochemistry. Freeze-drying of proteins: some emerging concerns*, str. 165–177.
- National Library of Medicine. (December 2016). *Evaluation of Melanoidins Formed from Black Garlic after Different Thermal Processing Steps*, str. 398–405.
- Petrovska, B. B., & Cekovska, S. (2010). Extracts from the history and medical properties of garlic. *Pharmacognosy reviews*, 106–110.
- Podjetje Galex d.d. (2024). *lekarnar.com*. Pridobljeno 3. september 2023 iz <https://www.lekarnar.com/clanki/vitamini-skupine-b>
- Ryu, H. J., & Kang, D. (2017). Physicochemical Properties, Biological Activity, Health Benefits, and General Limitations of Aged Black Garlic: A Review. *Molecules* .
- Smrdu, A. (2008). *Kemija 3: Snov in spremembe, učbenik za kmeije v 3. letniku gimnazije* . Ljubljana: Jutro.
- Stušek, N. (2013). VITAMIN C V PREHRANI STAROSTNIKA (Diplomsko delo). Maribor: Univerza v Mariboru: Fakulteta za zdravstvene vede.
- Sunkara, R., & Verghese, M. (2014). Functional foods for obesity management. *Food and Nutrition Sciences*, 1359–1369.
- Tran, G.-B., Pham, T.-V., & Trinh, N.-N. (2019). *Black Garlic and Its Therapeutic Benefits*. Ho Chi Minh City, Vietnam: IntechOpen.
- Uredniki MN. (Januar 2023). *microbiologynote.com*. Pridobljeno 6. september 2023 iz https://microbiologynote.com/sl/uv-vis-spektroskopija/#google_vignette
- Valič, J. (2016). *Univerza v Ljubljani*. Pridobljeno 10. januar 2023 iz <https://repozitorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=128813&lang=slv>
- Verma, S., Singh, A., & Mishra, A. (2013). Gallic acid: Molecular rival of cancer. *Environmental Toxicology and Pharmacology* , 473–485.
- Vrt Obilja. (brez datuma). Pridobljeno 10. januar 2023 iz <https://vrtobilja.si/portfolio/cesen>
- Wang, X., Jiao, F., Wang, Q., Wang, J., Yang, K., & Hu, R. (2012). Aged black garlic extract induces inhibition of gastric cancer cell growth in vitro and in vivo.
- wikipedia. (brez datuma). Pridobljeno 10. januar 2023 iz <https://sl.wikipedia.org/wiki/%C4%8Cesen>

Wu, J., Yan, J., & Zhang, M. (15. marec 2021). Food chemistry. *Evaluation on the physicochemical and digestive properties of melanoidin from black garlic and their antioxidant activities in vitro.*

Yuan, H., Sun, L., Chen, M., & Wang, J. (14. junij 2016). Journal of FOOD SCIENCE. *The Comparison of the Contents of Sugar, Amadori, and Heyns Compounds in Fresh and Black Garlic.*

Yuan, H., Sun, L., Chen, M., & Wang, J. (2016). The Comparison of the Contents of Sugar, Amadori, and Heyns Compounds in Fresh and Black Garlic.

Živko, U. (2024). *Farmedica*. Pridobljeno iz spletno mesto Farmedica:
<https://www.farmedica.si/si/dodatki/rastlina-cesen.html>

Žvab, K. (2021). Razvoj in optimizacija HPLC metode za določanje antimikrobnih substanc v suhem ekstraktu limone. Maribor.

7.2 VIRI SLIK

Slika 1: <http://mojalekarna.blogspot.com/2013/05/>, citirano dne 31. avgusta 2023

Slika 2: <https://en.wikipedia.org/wiki/Allicin#/media/File:R-allyl-2D-skeletal.svg>, citirano dne 19. novembra 2022

Slika 3: <https://en.wikipedia.org/wiki/Allicin#/media/File:L-allyl-2D-skeletal.png>, citirano dne 1. septembra 2023

Slika 4: <https://www.acs.org/molecule-of-the-week/archive/a/ascorbic-acid.html>, citirano dne 3. septembra 2023

Slika 5: <https://m.planet-lepote.com/crni-cesen-bolj-zdrav/>, citirano dne 7. aprila 2024

Slika 6: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1021949816301727>, citirano dne 7. aprila 2024

Slika 7: https://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/magistrske/2012/Zunic_Klun_Darja_mag_nal_2012.pdf, citirano dne 7. aprila 2024

Slika 8: <http://quimicaalkano.com/eng/product/vitamin-b3-niacin-nicotinic-acid/>, citirano dne 7. aprila 2024

Slika 9: <https://courses.lumenlearning.com/suny-nutrition/chapter/10-7-vitamin-b6/>, citirano dne 7. aprila 2024

Slika 10: <https://www.alphafoodie.com/how-to-make-black-garlic/>, citirano dne 7. aprila 2024

Slika 11: <https://ava-biochem.com/service/5-hydroxymethylfurfural/>, citirano dne 7. aprila 2024

Slika 12:
https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/0/0d/Gallic_acid.svg/1200px-Gallic_acid.svg.png, citirano dne 7. april 2024

Slika 13: <https://analizakrvi.wordpress.com/wp-content/uploads/2014/04/korscenj.jpeg>, citirano dne 7. aprila 2024

Slika 14: https://mz-at.de/fileadmin/user_upload/MZ-DC-TLC_img1.jpg, citirano dne 7. aprila 2024

Slika 15: <https://microbenotes.com/wp-content/uploads/2018/10/High-Performance-Liquid-Chromatography-HPLC.jpg>, citirano dne 7. aprila 2024

Slika 16: <https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcSpejWTHsRpBft5TEDoHm-YPoR4eSrGgcWFQwPZlacx&s>, citirano dne 7. aprila 2024

Slike 17–32: Pia Olga Šepec in Eva Urankar