



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI
CAMPUS DI CESENA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN
SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

Studio delle caratteristiche compositive, nutrizionali e del processo produttivo dell'aglio nero.

Tesi di laurea magistrale in
Microbiologia degli alimenti

Relatore
Prof. Lorenzo Nissen

Correlatore
Dott. Davide Addazii

Presentata da Cedric Blerio Houmba
Matricola N° 989985

Sessione Unica
Anno Accademico 2022/2023

Sommario

1 INTRODUZIONE e SCOPO.....	4
2. COMPONENTI CARATTERISTICI E I LORO MECCANISMI DI FORMAZIONE NELL'AGLIO NERO	6
2.1 CONTENUTO DI UMIDITÀ.....	6
2.2 LIPIDI.....	8
2.3 CARBOIDRATI.....	9
2.5 ACIDI ORGANICI.....	12
2.6 COMPOSTI ORGANICI DELLO ZOLFO.....	12
2.7 ALCALOIDI.....	16
2.8 POLIFENOLI.....	17
2.9 MELANOIDINE.....	18
2.10 5-IDROSSIMETIL FURFURALE.....	20
2.11 VITAMINE E MINERALI	23
2.12 ENZIMI	24
2.13 ENDOFITI DELL'AGLIO	25
3. VALORE NUTRIZIONALE E ATTIVITA' BIOLOGICA DELL'AGLIO NERO.....	26
3.1 ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE	26
3.2 ATTIVITÀ ANTICANCRO.....	27
3.3 ATTIVITÀ ANTI OBESITÀ	27
3.4 ATTIVITÀ ANTIINFIAMMATORIA	28
3.5 ATTIVITÀ IMMUNOSTIMOLANTE	28
3.6 ATTIVITÀ ANTIALLERGICA.....	29
3.7 ATTIVITÀ EPATOPROTETTIVA E CARDIOPROTETTIVA.....	29
3.8 ALTRI EFFETTI BIOLOGICI	30
4. PROCESSI PER TRASFORMARE L'AGLIO FRESCO IN AGLIO NERO	30
4.1 FATTORI CHE INFLUENZANO LA QUALITÀ DELL'AGLIO NERO	30
4.1.1 EFFETTI DOVUTI ALLA MATERIA PRIMA.....	31
4.1.2 PRETRATTAMENTO DELL'AGLIO FRESCO	31
4.1.3 TEMPERATURA DI LAVORAZIONE	32
4.1.4 UMIDITÀ DI LAVORAZIONE.....	35
4.2 INTERAZIONI TRA COMPONENTI DELL'AGLIO NERO	37
4.3 ATTIVITÀ MICROBIOLOGICA DEI BIOATTIVI DELL'AGLIO NERO	40
5. MIGLIORAMENTI DEL PROCESSO	41
5.1 FERMENTAZIONE MICROBICA DELL'AGLIO	42

5.2 IL DESTINO DEI COMPONENTI DELL'AGLIO NERO DOPO IL CONSUMO	44
6. CONCLUSIONI DELLO STATO DELL'ARTE.....	47
7. ALTRI PRODOTTI INVECCHIATI TERMICAMENTE	48
7.1 CIPOLLA NERA	48
7.2 SCALOGNO NERO (ALLIUM ASCALONICUM).....	50
7.3 AGRUMI NERI	51
8 FASE SPERIMENTALE: STUDIO DI FATTIBILITÀ	52
8.1 MATERIALI E METODI.....	52
8.1.1 PRODUZIONE AGLIO NERO	52
8.1.2 CAMPIONAMENTO MICROBICO	53
8.1.3 PH E AW	54
8.1.4 UMIDITÀ	54
8.1.5 COLORE.....	55
8.1.6 PROPRIETÀ MECCANICHE.....	55
8.1.6 ANALISI DI ALCUNI COMPOSTI VOLATILI CON HSPME GCMS.....	56
8.2 RISULTATI E DISCUSSIONE.....	57
8.2.1 EVOLUZIONE DELLA CARICA MICROBICA	57
8.2.2 PH E AW	58
8.2.3 UMIDITA.....	60
8.2.4 COLORE.....	61
8.2.5 PROPRIETÀ MECCANICHE.....	62
8.2.6 ALCUNI COMPOSTI VOLATILI.....	63
9. CONCLUSIONE PARTE SPERIMENTALE	64
10 BIBLIOGRAFIA	65

1 INTRODUZIONE e SCOPO.

L'aglio nero è stato prodotto per la prima volta in Corea utilizzando un processo di fermentazione prolungata per diverse settimane. L'aglio veniva lasciato lentamente ossidare e fermentare in una tradizionale pentola per il riso per diverse settimane, a una temperatura di 60°C. Dopo circa 60 giorni in un'alta umidità (85%), si sviluppavano spicchi neri con una consistenza appiccicosa, simile a datteri essiccati e un sapore che ricordava il caramello. Questo modo di trasformare l'aglio porta a una maggiore presenza di antiossidanti e vitamina C. L'aglio nero potrebbe anche aiutare a regolare il livello di zucchero nel sangue, influenzare positivamente la salute del cervello, del fegato e del cuore, e persino combattere il cancro. In Corea, l'aglio nero è un condimento popolare che è apprezzato sia per le sue proprietà antiossidanti sia ampiamente utilizzato per dare una spinta di sapore ai cibi e persino alle bevande energetiche. Sebbene le origini esatte dell'aglio nero siano poco chiare, l'aglio in generale è stato usato come medicina fin dal momento in cui è stato scoperto come cibo. È stato tradizionalmente utilizzato per i suoi benefici in molte regioni dell'Asia e non sembra destinato a diminuire di popolarità.

L'aglio (*Allium sativum* L.), è una pianta medicinale commestibile (verdura cruda) e/o ingrediente (spezia per uso culinario), appartiene al genere *Allium* delle *Liliaceae* ed è nota in tutto il mondo come "antibiotico naturale" (Petrovska e Cekovska, 2010).

L'aglio fresco contiene carboidrati (dal 26% al 30%, compresa 1,5% di fibra alimentare), proteine (fino a 2,1% con aminoacidi da 1,0% a 1,5%), lipidi (fino a 0,2%), composti organici dello zolfo (OSC; dall'1,1% al 3,5%), composti fenolici (fino a 0,5%) e composti dell'acido gallico (GAE) e sostanze complesse, come le saponine (0,11%); lectine o agglutinine (0,028%) e prostaglandine (0,056%) (Al-Nagdy *et al.*, 1988; Clement *et al.*, 2010; Rahman, 2003). L'aglio contiene anche una serie di vitamine (dallo 0,058% allo 0,059%) e minerali (dallo 0,72% allo 0,84%) come la vitamina C, la vitamina E, la tiamina (VB1), riboflavina (VB2), niacina (VPP), calcio, sodio, ferro, germanio e selenio (USDA, 2018). La composizione chimica dell'aglio fresco varia in base alla varietà, all'origine, e alle pratiche agronomiche condotte (Zhao, 2017). Il principale precursore responsabile del sapore distinto dell'aglio è l'alliina o S-allil-cisteina solfossido (Horníčková *et al.*, 2010). Fin dall'inizio del XX secolo è stata riscontrata un'ampia gamma di funzionalità dell'aglio, tra cui quelle antiossidanti (Jeong *et al.*, 2016), antinfiammatorie (Kim, Choi, *et al.*, 2011), antidiabetiche (Eidi, & Esmaeili, 2016), anti-iperlipidemico (Sangeetha e Quine, 2009), anti-invecchiamento (Avci *et al.*, 2008), anti-allergico (Yoo, Sok, e Kim, 2014),

epatoprotettivo (Nwokocha *et al.*, 2012), antitumorale (Galeone *et al.*, 2006), antimicrobico e di rafforzamento dell'immunità (Sahu *et al.*, 2007; Ye e Zhang, 2003). Tale bontà dell'aglio, tuttavia, è stata sottostimata dall'uomo, in quanto il consumo di aglio crudo o addirittura cotto è limitato a causa del suo odore pungente e del suo sapore intenso, che provoca persino disturbi gastrici (Corzo-Martínez *et al.*, 2007). Di conseguenza, fra i differenti approcci tecnologici per risolvere il problema, la trasformazione dell'aglio fresco in aglio nero, utilizzando varie tecnologie di lavorazione (tra cui il trattamento termico, l'invecchiamento, la fermentazione) è sicuramente la migliore e più diffusa, perché permette di ridurre al minimo gli odori indesiderati dell'aglio, migliorandone al contempo la palatabilità e mantenendo o aumentando le sue funzionalità benefiche.

L'aglio nero è essenzialmente un alimento trasformato ed emerge come un nuovo prodotto con caratteristiche distinte. Pertanto, sia la natura dell'aglio fresco iniziale che il metodo di lavorazione governano le caratteristiche finali dell'aglio nero. L'aglio nero, che ha origine in Giappone, sta guadagnando popolarità in diversi Paesi, come la Cina, la Corea del Sud, gli Stati Uniti e l'Europa grazie ai suoi profili unici di sostanze nutritive e bioattive, nonché il miglioramento degli attributi sensoriali rispetto all'aglio fresco (Kim *et al.*, 2012). In breve, L'aglio nero viene prodotto attraverso la lavorazione dell'aglio fresco ad alta temperatura controllata (da 60 a 90°C) e ad alta umidità controllata (dal 70% al 90%) per un periodo di tempo che comporta anche una fermentazione spontanea e una serie di reazioni chimiche (Martínez-Casas *et al.*, 2017; Sato *et al.*, 2006).

A causa delle variazioni nelle condizioni di lavorazione, tra cui temperatura, umidità di lavorazione, pretrattamento, manipolazione e trattamento successivo alla produzione, è stata ottenuta una serie di prodotti con composizioni e proprietà fisico-chimiche diverse. Tuttavia, la trasformazione di aglio fresco (FG) in aglio nero (BG) comporta modifiche nelle caratteristiche sensoriali, quali il cambiamento del colore verso tonalità più scure, l'induzione di sapori dolci e aspri, la generazione di una consistenza gelatinosa in bocca e l'aumento della masticabilità, oltre alla riduzione dell'acidità nel sapore. A livello fisico-chimico, ciò si riflette nella diminuzione dei polisaccaridi e nell'aumento delle melanoidine, degli zuccheri riducenti, degli acidi organici e degli intermedi aromatici come furano, tiofene e pirazina, oltre alla presenza di sostanze bioattive quali il 5-idrossimetilfurfurale (5-HMF), gli alcaloidi β -carbolina e la S-allilcisteina (SAC) (Lu *et al.*, 2007; Martínez-Casas *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2016). Attualmente, esistono ancora sfide associate alla produzione di prodotti BG stabili, con qualità controllabile e benefici per la salute. Questi problemi sono principalmente attribuibili alla scarsa comprensione dei meccanismi sottostanti alla formazione e all'accumulo dei costituenti desiderati nell'aglio nero, ad eccezione della reazione di Maillard, un processo di imbrunimento non enzimatico che avviene durante i trattamenti termici (Bae *et al.*, 2014; Liang *et al.*, 2015). Esistono significative lacune nella comprensione della

relazione tra processi di lavorazione, composizione e funzionalità/sicurezza nell'ambito della produzione di aglio nero. In particolare, c'è bisogno di esaminare il potenziale coinvolgimento delle tecnologie di lavorazione innovative rispetto ai metodi convenzionali e l'influenza della presenza di microrganismi desiderati e indesiderati nella formazione di aglio nero. Pertanto, attraverso questa tesi una revisione esaustiva della letteratura scientifica relativa a questi aspetti può delineare le prospettive future per la ricerca e lo sviluppo di aglio nero, ampliando la comprensione delle vie di trasformazione e delle reazioni che modulano le qualità sensoriali e nutrizionali del prodotto. Nella parte sperimentale è stata realizzata una prova su scala di laboratorio per verificare la fattibilità di produrre aglio nero a partire da Aglio Rosso di Sulmona e i risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli derivanti da un processo analogo ma a partire dall'Aglio di Voghiera, ritenuto un benchmark nella scelta della materia prima.

2. COMPONENTI CARATTERISTICI E I LORO MECCANISMI DI FORMAZIONE NELL'AGLIO NERO

Esistono cambiamenti significativi nella composizione chimica quando l'aglio fresco viene convertito in aglio nero (come riassunto nella Tabella 1)

2.1 CONTENUTO DI UMIDITÀ

Durante il trattamento termico dell'aglio fresco, il contenuto di umidità diminuisce continuamente (dal 62-68% al 45-54%) a causa dell'evaporazione dell'acqua (Bae *et al.*, 2014). Un contenuto di umidità nell'intervallo 45%-54% favorisce lo sviluppo di una struttura favorevole dell'aglio nero (consistenza flessibile e gommosa) (Zhang, Li *et al.*, 2016). Una temperatura di lavorazione più elevata porterebbe a una diminuzione più rapida del contenuto di umidità (Zhang *et al.*, 2016).

Tabella 1: Confronto sui costituenti caratteristici tra l'aglio fresco e l'aglio nero

Costituenti	Aglio fresco (FG)		Aglio nero (BG)		Cambiamenti da aglio fresco a aglio nero
	Quantità	Riferimento	Quantità	Riferimento	
Attività dell'acqua	0.98	Toledano-Medina <i>et al.</i> , 2016	0.93 ± 0.02	Toledano-Medina <i>et al.</i> , 2016	↓
Zucchero idrosolubile	72.29% DM	Sasaki <i>et al.</i> , 2007	85.61% DM	Sasaki <i>et al.</i> , 2007	↑
Zuccheri riducenti	5.9 ± 0.8 g/kg DM	Martínez-Casas <i>et al.</i> , 2017	472.4 ± 46.5 g/kg DM	Martínez-Casas <i>et al.</i> , 2017	↑

Lipidi	1.8 ± 0.1 g/kg FM 3.3 ± 0.4 g/kg FM	Choi <i>et al.</i> , 2008 Lu, 2017	5.8 ± 1.1 g/kg FM 1.6 ± 0.2 g/kg FM	Choi <i>et al.</i> , 2008 Lu, 2017	↑ ↓
Proteine	8.4% FM	Sasaki <i>et al.</i> , 2007	9.1% FM	Sasaki <i>et al.</i> , 2007	↑
Aminoacidi	19.43 ± 0.01 mg/g FM	Lu, 2017	14.86 ± 0.01 mg/g FM	Lu, 2017	↓
SAC	19.61 ± 0.35 µg/g DM	Bae <i>et al.</i> , 2014	105.07 ± 27.73 µg/g DM	Bae <i>et al.</i> , 2014	↑
Acidi organici	16.68 ± 0.61 g/kg DM	Zhang, Li, <i>et al.</i> , 2016	64.18 ± 7.55 g/kg DM	Zhang, Li, <i>et al.</i> , 2016	↑
Allicina	11.28 ± 0.22 g/kg FM	Zhang <i>et al.</i> , 2015	2.31 ± 0.07 g/kg FM	Zhang <i>et al.</i> , 2015	↓
Polifenoli	38.87 ± 4.53 mg GAE/g DM	Choi <i>et al.</i> , 2014	68.95 ± 1.63 mg GAE/g DM	Choi <i>et al.</i> , 2014	↑
Melanoidine	<0.1 OD FM	Yuan <i>et al.</i> , 2018	Approssimativamente 1.8 OD FM	Yuan <i>et al.</i> , 2018	↑
Alcaloidi	Tracce	Sato, Kohno, & Niwano, 2006	Aumento di 28.55 volte di FM	Sato <i>et al.</i> , 2006	↑
5-HMF	Non rilevato	Li <i>et al.</i> , 2015	0.23 ± 0.04 g/kg FM	Li <i>et al.</i> , 2015	↑
Vitamine	6.92 ± 0.02 g/kg DM	Kim <i>et al.</i> , 2013b	9.26 ± 0.03 g/kg DM	Kim <i>et al.</i> , 2013b	↑
Minerali	11.74 ± 0.02 g/kg DM	Kang, 2016b	13.14 ± 0.03 g/kg DM	Kang, 2016b	↑
SOD	12.96 g/kg FM	He <i>et al.</i> , 2008	Non rilevato		↑

Abbreviazioni: Aw, attività dell'acqua; GAE, equivalenti di acido gallico; FM, materia fresca; DM, materia secca; 5-HMF, 5-idrossi metil furfurale; SAC, S-allil-L-cisteina; SOD, superossido dismutasi; OD, densità ottica per un'assorbanza a 420 nm

Inoltre, un'umidità relativa più elevata comporta probabilmente un maggiore contenuto di umidità nel prodotto lavorato (Sun e Wang, 2018). Toledano-Medina e colleghi (2016) hanno osservato una significativa diminuzione dell'attività dell'acqua (Aw) nell'aglio fresco durante il trattamento termico. In particolare, durante il riscaldamento a 78°C e con un'umidità relativa del 90% per 14 giorni, l'Aw è scesa da 0,97 a 0,93 nell'aglio nero. Analogamente, durante il riscaldamento a 75°C per 21 giorni e a 72°C per 33 giorni, l'Aw è diminuita rispettivamente a 0,94 e 0,91, partendo da un valore iniziale di 0,97.

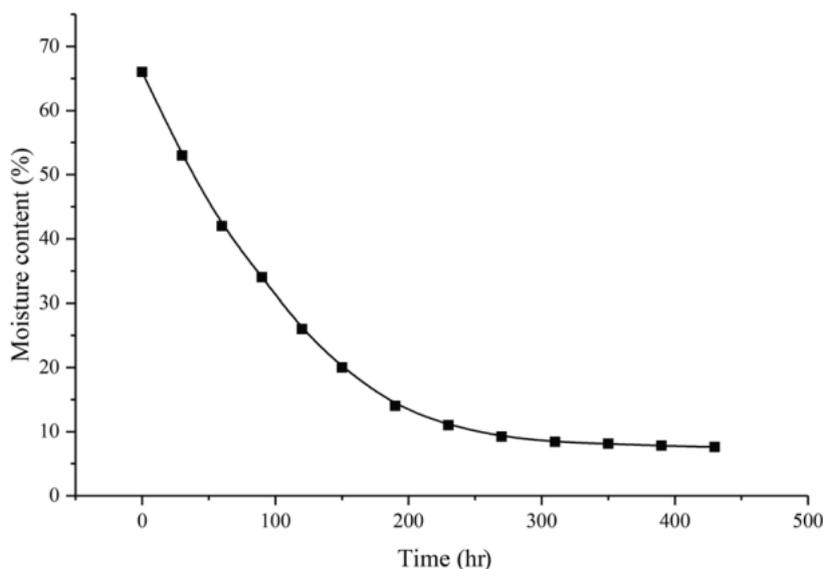


Figura 1: Tipico diagramma contenuto di umidità-tempo per l'essiccazione di spicchio d'aglio in fette a 70°C

Come mostrato nella Figura 1, l'andamento del contenuto di umidità degli spicchi d'aglio ridotti a fette durante l'essiccazione segue la tendenza generale della maggior parte delle matrici alimentari: una rapida diminuzione iniziale seguita da un lento declino prima di un plateau (raggiungimento di un equilibrio) (Krokida *et al*, 2003). Con il progredire della lavorazione, si verifica una riduzione e persino una perdita della capacità iniziale di trattenere l'acqua, a causa della graduale degradazione di questi costituenti iniziali (come i fruttani) (Petersson *et al*, 2013). È stato riscontrato che l'attività dell'acqua è strettamente associata al tasso di imbrunimento degli alimenti (Labuza e Baisier, 1992). Quando l'attività dell'acqua (A_w) varia da 0,5 a 0,75, con un corrispondente contenuto di umidità del 10%-15%, il tasso di reazione di imbrunimento probabilmente raggiunge un massimo.

Un valore troppo basso di A_w limita i movimenti molecolari per i composti contenenti gruppi di reazione amminici e/o carbonilici, mentre un A_w troppo alta tende ad inibire la reazione di Maillard (poiché la reazione produce acqua) (Labuza e Saltmarch, 1981).

2.2 LIPIDI

Il contenuto di lipidi estratti d'aglio fresco è circa lo 0,4% della sostanza fresca e 0,6% sulla sostanza secca (Kamanna e Chandrasekhara, 1980; Tsiaganis *et al*, 2006). Oltre a servire come fonte di nutrienti ed energia, i lipidi presenti nell'aglio fresco e aglio nero contribuiscono in modo significativo alle loro caratteristiche sensoriali. I lipidi estratti dall'aglio fresco utilizzando cloroformio-metanolo sono stati riportati come contenenti il 62,6% di lipidi neutri, 14,0% glicolipidi e 23,4% fosfolipidi (Kamanna e Chandrasekhara, 1980). Tra questi, l'acido linoleico (\square -6), l'acido palmitico, l'acido linolenico (\square -3) e l'acido oleico (\square -9) sono risultati essere gli acidi

grassi più abbondanti (Tsiaganis *et al.*, 2006). Durante lo sviluppo dell'aglio nero, sono stati riscontrati cambiamenti nel profilo lipidico a causa della loro ossidazione e partecipazione a reazioni chimiche, anche se sono stati riportati contenuti lipidici incoerenti o addirittura controversi. Per esempio, Choi e colleghi (2008) hanno mostrato che il contenuto di lipidi grezzi è aumentato significativamente (dallo 0,18% allo 0,58%) dopo la trasformazione di aglio fresco in aglio nero, mentre Lu (2017), ha riportato che il livello di lipidi grezzi nell'aglio fresco e nel corrispondente aglio nero era rispettivamente dello 0,33% e dello 0,16%. Queste discrepanze sono probabilmente dovute alle differenze nel tipo di aglio, nella procedura di lavorazione (comprese le fasi di riscaldamento e fermentazione), nei metodi di estrazione e di analisi, nonché alle variazioni del contenuto di umidità di aglio fresco e aglio nero. I lipidi dell'aglio possono subire alterazioni idrolitiche e ossidative, soprattutto nelle condizioni di trasformazione di aglio fresco in aglio nero con temperatura elevata (da 60 a 90°C) e alta umidità (70%-90%). Di conseguenza, viene prodotta una serie di composti come alcoli, aldeidi, chetoni e lattoni. Questi prodotti, insieme agli acidi grassi, partecipano a una serie di reazioni chimiche complesse, tra cui l'idrolisi, l'ossidazione e la reazione di Maillard (Zamora e Hidalgo, 2005). Tutto ciò spiega perché il contenuto di lipidi nell'aglio nero trasformato è inferiore a quello dell'aglio fresco.

2.3 CARBOIDRATI

L'aglio fresco e l'aglio nero sono entrambi ricchi di carboidrati (Tabella 1). Tuttavia, il profilo dei carboidrati nell'aglio fresco cambia durante il processo di trasformazione in aglio nero. I carboidrati rappresentano il 22-26% della sostanza fresca o il 77% della sostanza secca dell'aglio e sono costituiti principalmente da polisaccaridi e da piccole quantità di oligosaccaridi e monosaccaridi (Koch e Lawson, 1996; USDA, 2018). Alcune ricerche hanno identificato la presenza di fruttani a base di neokestosio nell'aglio, con un peso molecolare di circa 9500 Da e un grado di ramificazione di 9. Durante il processo termico di trasformazione dell'aglio fresco in aglio nero, i fruttani vengono gradualmente decomposti in monosaccaridi (principalmente glucosio e fruttosio), disaccaridi e oligosaccaridi, attraverso la degradazione indotta dal calore e l'enzimolisi catalizzata dalla esoidrolasi del fruttosio dell'aglio (Cheong *et al.*, 2012; Liang *et al.*, 2015). Alcuni studi hanno riportato che la degradazione dei polisaccaridi è dovuta principalmente al trattamento termico piuttosto che all'idrolisi enzimatica, con la distribuzione del peso molecolare e il tasso di degradazione dei polisaccaridi strettamente associati alla temperatura di lavorazione (Lu *et al.*, 2018). Quando l'aglio fresco viene lavorato a temperature relativamente basse (ad esempio, da 70 a 80°C), la degradazione dei polisaccaridi nell'aglio nero seguirebbe la cinetica di reazione del primo ordine, con un tasso di degradazione inferiore e una relazione lineare tra il tempo di lavorazione.

MW al tempo t e 0, rispettivamente), indicando una scissione casuale della catena e la frattura di \square (1 \rightarrow 2) legami glicosidici (Emsley e Heywood, 1995; Lu *et al.*, 2018). Se il riscaldamento è stato condotto a una temperatura più elevata (come 85 o 90°C), la degradazione dei polisaccaridi dell'aglio è più rapida nella fase iniziale che in quella successiva, con una relazione non lineare tra il reciproco di MW e t (che si verifica in processi sistematici e principalmente nelle scissioni delle catene centrali) (Blecker *et al.*, 2002; Emsley e Heywood, 1995). È stato ipotizzato che l'idrolisi e la depolimerizzazione potrebbe iniziare con la protonazione dell'ossigeno glicosidico, prima che i polisaccaridi subiscano un'ulteriore degradazione indotta dai carbocationi ciclici (Nattorp *et al.*, 1999). I fruttoligosaccaridi (FOS) sono oligosaccaridi funzionali composti da molecole di fruttosio legate tramite legami glicosidici \square (1 \rightarrow 2) con un grado di polimerizzazione da 2 a 10, che sono riconosciuti per i loro effetti prebiotici nel promuovere la crescita e la funzione di microrganismi benefici nel tratto gastrointestinale (Flickinger *et al.*, 2003). A seconda della cultivar dell'aglio fresco e dal tipo di tecnologia di lavorazione, l'aglio nero può avere un contenuto di zuccheri riducenti da 30 a 80 volte superiore a quello dell'aglio fresco e questo spiega lo spiccato sapore dolce dell'aglio nero (Qiu *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2016). Zhang e colleghi (2015) hanno riportato che l'aglio nero ottenuto tramite trattamenti termici comprendeva principalmente fruttosio (57,14%), saccarosio (7,62%) e glucosio (6,78%). Martínez-Casas e colleghi (2017) hanno riscontrato un aumento significativo del fruttosio (da 0,38 a 44,73 g/100 g di sostanza secca nell'aglio nero), seguito dal glucosio (da 0,21 a 2,51 \pm g/100 g di sostanza secca).

2.4 PROTEINE

L'aglio fresco ha generalmente dall'1,5% al 2,1% di proteine sulla sostanza fresca (Koch e Lawson, 1996; USDA, 2018), ed è ricco di aminoacidi liberi a seconda della varietà e dell'ambiente di coltivazione dell'aglio (Lee e Harnly, 2005). Glutammina, asparagina e acido glutammico sono gli aminoacidi liberi più abbondanti nell'aglio, con alcuni aminoacidi essenziali tra cui lisina, triptofano e valina (Lee e Harnly, 2005). Quando l'aglio fresco viene trasformato in aglio nero ad alte temperature, è possibile ci sia una denaturazione delle proteine e alcuni aminoacidi liberi partecipano alla reazione di Maillard. Il profilo degli aminoacidi varia in modo specifico a seconda delle condizioni di trasformazione dell'aglio fresco in aglio nero. Lu (2017) ha riportato la variazione della quantità totale di 18 aminoacidi essenziali liberi da 1943,31 a 1485,77 mg/100 g di sostanza fresca, con aumenti nelle quantità di alcuni aminoacidi liberi (tra cui leucina, isoleucina, fenilalanina, acido aspartico, alanina, cisteina e valina), in concomitanza con la diminuzione del contenuto di altri aminoacidi. Choi e colleghi (2014), che hanno trattato l'aglio a 70°C e 90% di umidità relativa, hanno dimostrato che il contenuto di aminoacidi ramificati in aglio nero erano più

alti di quelli presenti nell'aglio fresco (leucina e isoleucina da 59,19 e 71,07 mg/100 g, rispettivamente, a 58,62 e 50,04 mg/100g). Anche le quantità di fenilalanina e metionina sono aumentate in seguito a tale trattamento (l'aumento maggiore si è avuto con la fenilalanina: 2,57 volte superiore a quello dell'aglio fresco), mentre alcuni altri aminoacidi sono diminuiti in percentuali diverse (arginina, circa 90%; tirosina, circa 83%), invece, la glicina non è stata rilevata nell'aglio nero, mentre il suo contenuto nell'aglio fresco era di 21,5 mg/100 g. E' da sottolineare che il congelamento ha potuto influenzare ulteriormente il contenuto di aminoacidi nell'aglio nero; infatti, il contenuto di amino-n diminuiva del 50,97% a causa dell'accelerazione della reazione di Maillard e di alcune reazioni enzimatiche indotte dal danneggiamento delle cellule dell'aglio durante il processo di congelamento e scongelamento (Li *et al.*, 2015). La lavorazione dell'aglio nero (da 60 a 90°C) influenza le strutture secondarie, terziarie e/o quaternarie delle proteine, ma è improbabile che spezzi i legami covalenti dei peptidi per liberare nuovi aminoacidi liberi. Tuttavia, l'idrolisi enzimatica delle proteine causa probabilmente un aumento del contenuto di aminoacidi e può essere favorita in condizioni acide (a causa del pH tendente verso l'acidità durante la trasformazione dell'aglio fresco in aglio nero) (Liang *et al.*, 2015). Inoltre, la diminuzione del contenuto di alcuni aminoacidi (in particolare cisteina e tirosina) associata alla reazione di Maillard, dopo la trasformazione dell'aglio fresco in aglio nero, può essere strettamente associata ai cambiamenti dell'attività antiossidante dell'aglio (Hwang *et al.*, 2011). Un composto contenente aminoacidi, la SAC, merita attenzione, poiché questo composto biologicamente attivo e benefico per la salute, è presente sia nell'aglio fresco che nell'aglio nero ed è l'antiossidante più abbondante nell'aglio nero (Kodera *et al.*, 2002). Il contenuto di SAC nell'aglio fresco è stato rilevato in un intervallo compreso tra 21,52 e 22,73 µg/g di sostanza fresca (Bae *et al.*, 2012), e potrebbe essere aumentato in modo significativo, a causa del trattamento termico, fino a quattro o sei volte quello dell'aglio fresco, a seconda dell'effettiva temperatura di lavorazione. Il contenuto di SAC nell'aglio nero riscaldato a 40°C per 45 giorni è stato di 124,67 µg/g di sostanza secca, mentre solo 85,46 µg/g nell'aglio nero riscaldato a 85°C per 45 giorni (Bae *et al.*, 2014). La SAC è probabilmente formata attraverso l'idrolisi enzimatica della γ -glutamyl-S-allil cisteina (GSAC) da parte della γ -glutamyl transpeptidasi (GGT) a basse temperature da 30 a 50°C (Kodera *et al.*, 2002), che può essere influenzata dalla reazione mediata dall'acqua tra la GSAC e la GGT (Koch e Lawson, 1996). Ad alte temperature, la SAC potrebbe derivare dall'idrolisi della GSAC e dalla riduzione dell'alliina durante la lavorazione (Sasaki *et al.*, 2007). Un altro amminoacido importante è il γ -aminobutirrico (GABA), un aminoacido non proteico. Il suo contenuto tende a diminuire durante la produzione di aglio nero (Molina-Calle *et al.*, 2017), probabilmente a causa del danneggiamento degli amminoacidi e del coinvolgimento nelle reazioni non enzimatiche di imbrunimento. Lamberts e colleghi (2008) hanno riportato che il GABA era in grado di reagire con diversi zuccheri (xilosio,

glucosio, fruttosio, saccarosio e maltosio), nelle reazioni di Maillard per produrre pigmenti intermedi, con conseguente perdita di zuccheri e aminoacidi. Molina-Calle e colleghi (2017) hanno ipotizzato che la trasformazione dell'acido 4-guanidinobutanoico (come prodotto di degradazione dell'arginina durante il trattamento termico dell'aglio) ad acido aminobutirrico sia stata inibita nell'aglio nero; pertanto, l'acido aminobutirrico era significativamente più concentrato nell'aglio fresco rispetto all'aglio nero.

2.5 ACIDI ORGANICI

Gli acidi organici contenuti nell'aglio rivestono un ruolo significativo, considerando l'importanza degli acidi organici nell'assorbimento, nel mantenimento della salute dell'apparato digerente e nel supporto del sistema immunitario. (Kuang *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2008). L'aglio fresco ha un'acidità dello 0,40% (calcolata come acido lattico) (Rejano *et al.*, 1997). Nell'aglio, l'acido citrico è l'acido organico più abbondante, l'acido malico, l'acido lattico, l'acido formico e l'acido fumarico, sono anch'essi presenti in quantità relativamente elevate rispetto ad altri acidi organici (Liang *et al.*, 2015; Ritota *et al.*, 2012). Bae e colleghi (2014) hanno riportato il cambiamento del pH prima e dopo il trattamento termico da 6,42 (per l'aglio fresco) a 5,00 o 3,05 (per aglio nero ottenuto con trattamento a 40 o 85°C per 45 giorni). Zhang e colleghi (2016) hanno riportato la variazione del contenuto di acidi totali al termine della fermentazione: da 4,6 g/kg per l'aglio fresco a 33,61-37,50-30,96 e 36,37 g/kg per l'aglio nero ottenuto a 60, 70, 80 e 90°C, rispettivamente. Liang e colleghi (2015) hanno identificato la presenza di diversi acidi organici, tra cui l'acido citrico, l'acido malico, l'acido lattico e l'acido fumarico negli estratti di aglio fresco. In particolare, sono stati riscontrati livelli più elevati di acido formico e acido acetico nell'aglio nero. Questi cambiamenti negli acidi organici sono importanti. Un aumento del contenuto di acidi organici non solo conferisce un sapore agrodolce (oltre a ridurre gli zuccheri), ma facilita anche l'idrolisi delle proteine e dei polisaccaridi (Blecker *et al.*, 2002) e la stabilità microbica dei campioni di aglio nero (Rahman, 2007). L'aumento dell'acidità dopo il trattamento termico dell'aglio fresco deriva dal consumo di una grande quantità di gruppi alcalini (come il gruppo amminico degli aminoacidi) durante reazioni come la reazione di Maillard e la formazione di acidi carbossilici a catena corta (a causa della degradazione dei prodotti di Amadori e dei composti dicarbonilici) (Huyghues-Despointes, e Yaylayan, 1996).

2.6 COMPOSTI ORGANICI DELLO ZOLFO

I composti organici sulfurici presenti, come α -glutamyl-S-alc(en)yl-L-cisteine e S-alc(en)yl-L-cisteina solfossidi nell'aglio, meritano un'attenzione particolare per il loro importante contributo alle

proprietà medicinali e sensoriali dell'aglio e dei prodotti derivati (circa 1% DM) (Fenwick *et al.*, 1985). Durante la conservazione dell'aglio, l'alliina si accumula naturalmente, fino allo 0,9% di α -glutamilsteina e l'1,8% di alliina, che sono i precursori dei composti aromatici caratteristici dell'aglio (Amagase *et al.*, 2001). Un aglio fresco intatto non ha un odore pungente. I trattamenti termici applicati durante la lavorazione dell'aglio fresco danneggiano le cellule dell'aglio e i loro vacuoli, causando il rilascio di alliinasi (che può liquefare rapidamente i cisteina-solfossidi citosolici per formare alchil-alcano-tiosolfonati, principalmente allicina) (Lanzotti, 2006). L'allicina, instabile in condizioni di alta temperatura, può essere trasformata in breve tempo in altri derivati contenenti zolfo, conferendo all'aglio nero un sapore unico. È stato riscontrato mediante gascromatografia - spettrometria di massa (HGC-MS) che i profili volatili di aglio nero e aglio fresco differiscono in modo significativo: Il contenuto dei derivati della S-alk(en)yl-L-cisteina nell'aglio nero (meno del 28% della concentrazione totale relativa) è stato ridotto del 42%, rispetto a quello del corrispondente aglio fresco (fino al 70% della concentrazione relativa totale) (Molina-Calle *et al.*, 2017). L'aglio nero presenta quantità significativamente inferiori di diallyl trisolfidi (DATS), allyl metil trisolfidi e di 1,3 dithiane, ma quantità notevolmente più elevate di dimetil trisolfidi e di allyl metil solfidi, rispetto all'aglio fresco. L'allyl metil solfidi è il composto volatile più abbondante in aglio nero (18,2%), seguito dall'allyl metil trisolfidi (1,5%) e dal diallyl solfidi (DAS; 1,4%) (Molina-Calle *et al.*, 2017). Il furfurale (con sapore di arrosto) e la benzeneacetaldeide (con odore di mandorla amara) sono i composti aromatici più abbondanti in aglio nero (fino al 17,3% e al 12%, rispettivamente), ma non si ritrovano nell'aglio fresco. Il 3-Metilbutanale è il terzo composto per abbondanza nell'aglio nero (8,8%). Il 2-butenale, che si trovava nella quantità più alta nell'aglio fresco (12%), non si ritrova nei campioni di aglio nero mediante HGC-MS. (Molina-Calle *et al.*, 2017). I derivati del furfurale, il 2-acetilfurano (0,15%) e il 5-metilfurfurale (0,53%), hanno contribuito al caratteristico sapore dolce dell'aglio nero, insieme a 2,3-butandione (0,91%) e l'1-idrossi-2-propanone (0,74%) (Molina-Calle *et al.*, 2017). Inoltre, Kim e colleghi (2011) hanno riportato che la quantità totale di solfuri volatili negli spicchi di aglio nero invecchiato, differente dall'aglio nero tal quale, era leggermente inferiore a quella dell'aglio crudo schiacciato, e in aglio nero invecchiato, alcuni volatili pungenti, come il diallyl disolfidi (DADS) e DATS, sono diminuiti in modo significativo, mentre i composti aromatici sono aumentati. I principali volatili contenenti zolfo riscontrati nell'aglio sottoposto a trattamenti di invecchiamento ad alte temperature sono stati DADS (12,89%), 1,5-ditiocano (10,40%), O-metil 2-acetilidrazinecarbothioato (6,54%) e allyl solfidi /DAS (5,44%) (Kim *et al.*, 2011). Una forte diminuzione delle DADS, 3-vinil-1,2-ditiacicloes-ene e allilmercaptano è stata osservata quando l'aglio è stato invecchiato ad alta temperatura, con un aumento dei contenuti di allyl solfidi /DAS, allyl metil disolfidi e 1,5-ditiocano (Kim *et al.*, 2011). Pertanto, sono possibili variazioni nei profili volatili riportati per aglio fresco e

aglio nero a causa delle differenze tra varietà di aglio, tecnologia di lavorazione e metodo di analisi. I composti contenenti zolfo, tra cui il DAS, il DADS e l'allilmercaptano, si sono probabilmente formati come risultato della rapida degradazione dei composti di allina e deossiallina o tramite riarrangiamenti di radicali liberi quando l'aglio è stato trasformato in aglio nero ad alte temperature.

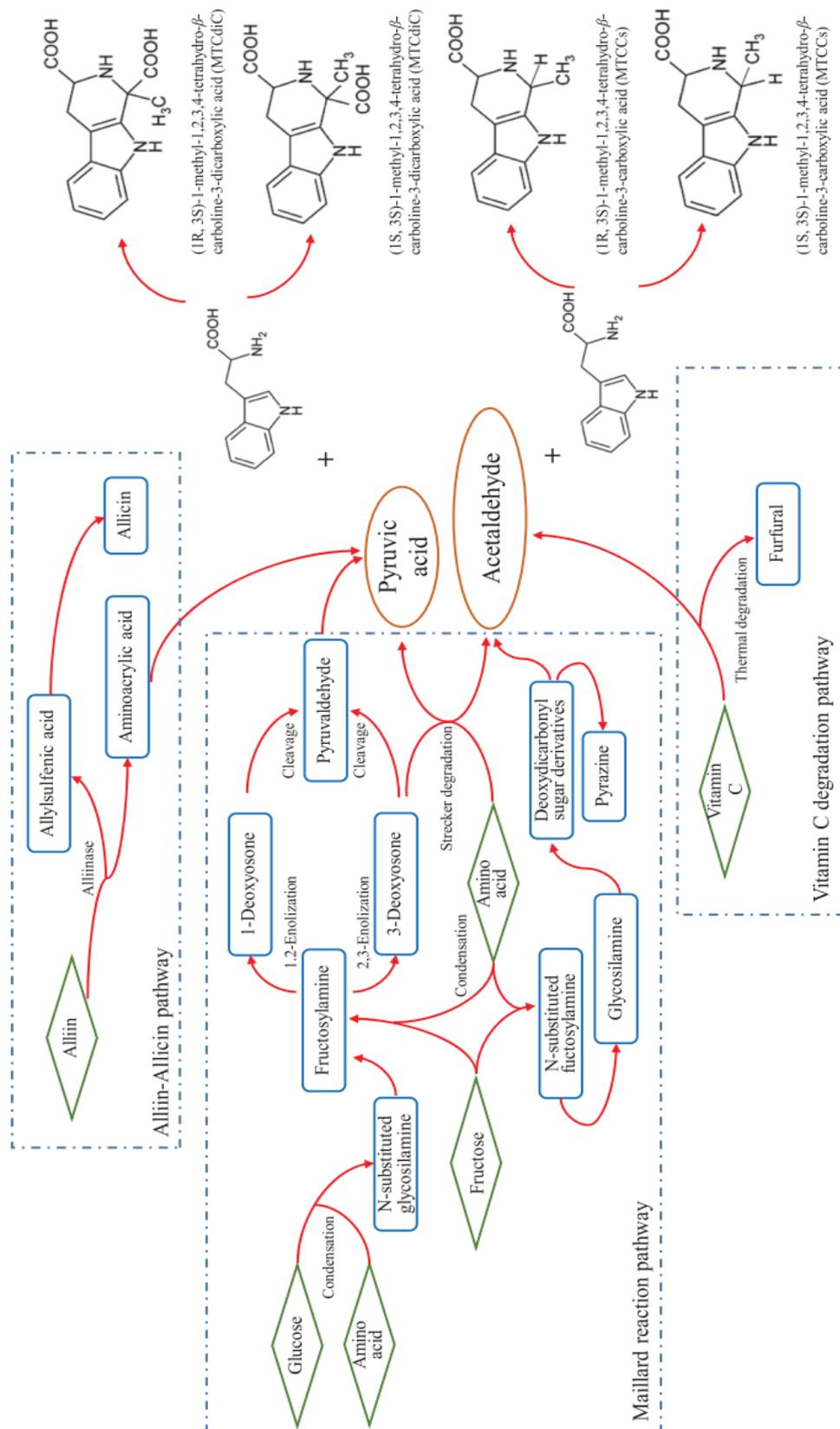


Figura 2. Potenziali vie per la formazione di derivati 1,2,3,4-tetraidro- β -carbolina durante la produzione di aglio nero.

Le reazioni che comportano la scissione dei legami S-S disolfuro avvengono in composti contenenti zolfo, come l'allyl solfidi, con formazione di gruppi alchil-solfidi e gruppi propilenici (che potrebbero interagire ulteriormente con composti volatili a basso peso molecolare come l'allyl mercaptano e l'idrogeno solforato, per formare DAS e composti ciclici quali DADS e 2-vinil-1,3-ditiano) (Yu, *et al.*, 1994). Alcuni composti solforati prodotti durante la fermentazione possono conferire un leggero aroma gradevole e contribuire a eliminare l' indesiderato odore pungente e l'irritazione gastrointestinale (Lanzotti, 2006).

Il DAS è la principale sostanza dei composti organici dello zolfo solubile in olio, derivato dal metabolismo dell'allicina e probabilmente formato tramite reazioni tra alcool allilico e radicali liberi di solfuro allilico, mercaptano allilico o alliina/deossialliina. Il DAS può agire come agente efficace per la prevenzione o il trattamento delle cellule tumorali, sebbene possa presentare reazioni allergiche apprezzabili e causare tossicità cellulare (Jin e Baillie, 1997).

2.7 ALCALOIDI

Gli alcaloidi della carbolina sono un ampio gruppo di composti naturali e sintetici che possono essere derivati dal triptofano (Allen & Holmstedt, 1980). Le β -carboline, che sono ampiamente distribuite in natura, hanno attirato molta attenzione in quanto presentano diverse proprietà biologiche e farmacologiche, come effetti ansiolitici, antitumorali, antiparassitari, antivirali e antimicrobici (Cao *et al.*, 2007). Il contenuto iniziale di β -carboline nell'aglio fresco è per lo più molto basso, ma l'invecchiamento e il trattamento termico dell'aglio fresco possono aumentare in modo significativo il contenuto di derivati 1-metil-1,2,3,4-tetraidro- β -carbolinici (TH β Cs), (Ichikawa *et al.*, 2006). Ichikawa e colleghi (2002) hanno identificato alcaloidi con una significativa attività antiossidante in un estratto di aglio invecchiato: 1-metil-1,2,3,4-tetraidro- β -carboline-3-carboxylic acids (MTCC) e 1-methyl-1,2,3,4-tetraidro- β -carbolina-1,3-dicarbossilico (MTCdiC) diastereoisomeri (come mostrato nella Figura 2). Sato e colleghi (2006) hanno riportato che i contenuti di (1R, 3S) -MTCC e (1S, 3S) -MTCC in aglio nero sono aumentati significativamente dopo il processamento a 60-70°C e 85%-95% di umidità relativa per 40 giorni, rispetto a quelli nell'aglio fresco in cui ce ne sono solo tracce.

I TH β C sono prodotti tramite condensazione Pictet-Spengler tra triptofano e aldeidi o acidi α -oxo durante la produzione, conservazione e lavorazione degli alimenti (Whaley e Govindachari, 2004). Le nuove sostanze generate (come l'acetaldeide e il metilgliosale) dalla reazione di Maillard e dalla successiva degradazione di Strecker possono reagire con le molecole di triptofano nell'aglio per sintetizzare ulteriori MTCC (1a/b) e MTCdiC (2a/b) tramite condensazione (Wnorowski e

Yaylayan, 2000). L'acetaldeide è nota come precursore degli MTCC (1a/b), mentre l'acido piruvico e/o piruvaldeide agisce come precursore degli MTCdiC (2a/b) (Herraiz & Ough, 1993; Ichikawa *et al.*, 2002). Di conseguenza, la maggiore quantità di MTCC, rispetto a quella di MTCdiCs, è probabilmente dovuta a una maggiore quantità di acetaldeide che si forma attraverso la reazione di Maillard durante la trasformazione di aglio fresco in aglio nero.

2.8 POLIFENOLI

I polifenoli sono un gruppo di composti aromatici e che contengono uno o più anelli aromatici con uno o più gruppi idrossilici, tra cui tannini, flavonoidi e acidi fenolici. I polifenoli sono ampiamente distribuiti negli alimenti come frutta, verdura e cereali, e presentano potenti e diverse capacità antiossidanti (che sono strettamente correlate al potenziamento immunitario, alla promozione della digestione e all'inibizione delle cellule tumorali) (Bozin *et al.*, 2008; Olsson *et al.*, 2004; Tagliazucchi *et al.*, 2005). L'aglio è una delle fonti più ricche di composti fenolici tra i comuni vegetali nella dieta umana. La quantità totale di composti fenolici nell'aglio fresco varia da 3,4 a 10,8 mg GAE/g DM, con una media di 6,5 mg GAE/g DM. Il contenuto totale di acidi fenolici varia da 1,9 a 20,9 mg/kg DM, con una media di 7,6 mg/kg di prodotto, e l'acido caffeico è il più dominante (2,9 mg/kg di prodotto), seguito da acido ferulico, acido vanillico e acido p-idrossibenzoico. Variazioni nel tipo e nel contenuto di composti fenolici sono state trovate tra i prodotti a base di aglio, a causa delle loro varietà, delle pratiche agronomiche e delle condizioni ambientali, tra cui il luogo di crescita, il clima e la stagione (Beato *et al.*, 2011). Quando l'aglio fresco viene trasformato in aglio nero ad alte temperature, la quantità totale di polifenoli presenti nell'aglio è risultata aumentare significativamente di 9 volte (Martínez-Casas *et al.*, 2017; Sato *et al.*, 2006), il contenuto totale di flavonoidi e il contenuto totale di acidi fenolici sono aumentati fino a 6 volte (Choi *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2013; Shin *et al.*, 2008). Di conseguenza, l'aglio nero possiede una maggiore attività antiossidante rispetto all'aglio fresco originale. Kim e colleghi (2013) hanno riportato che i derivati dell'acido idrossicinnamico erano i più abbondanti acidi fenolici nei campioni di aglio sottoposti a diverse procedure di lavorazione, con l'acido p-cumarico e l'acido o-cumarico che avevano l'aumento più significativo (di 14 volte). Risultati simili (aumento quantità di flavonoidi e di altri composti fenolici) sono stati riportati anche per altri alimenti sottoposti a trattamento termico, come arance, funghi e semi d'uva (Choi *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006; Scalzo, Iannoccaro *et al.*, 2004). Dewanto e colleghi (2002) hanno ipotizzato che l'incremento osservato nei livelli di polifenoli e flavonoidi possa essere attribuito all'aumentata estraibilità di tali composti. Questo fenomeno potrebbe derivare dalla liberazione di tali molecole dalla matrice cellulare del materiale vegetale, causata dalla disgregazione o distruzione delle

strutture cellulari durante il trattamento termico ad alte temperature. Inoltre, gli acidi fenolici presentano un'eccellente stabilità in queste forme, ma possono essere rilasciati dalle loro matrici quando le strutture dei vacuoli e delle pareti cellulari vengono distrutte (Bunea *et al.*, 2008). La lavorazione ad alte temperature per un lungo periodo potrebbe causare una diminuzione del contenuto di alcune sostanze fenoliche, a causa della perdita di quantità di polifenoli (Martínez-Casas *et al.*, 2017).

2.9 MELANOIDINE

Le melanoidine sono polimeri a base di carboidrati e contenenti azoto, di colore marrone, con peso molecolare elevato, diversi gradi di polimerizzazione, che spesso si formano nelle fasi finali della reazione di Maillard, durante la lavorazione e la conservazione degli alimenti (Borrelli *et al.*, 2002). Sia la natura dei materiali di partenza (come il tipo di zucchero) sia le condizioni di reazione (come il pH delle loro matrici) influenzano la composizione elementare, la struttura e la MW delle melanoidine risultanti (Cämmerer e Kroh, 1995; Fogliano *et al.*, 1999). Negli ultimi anni è stato dimostrato che le melanoidine generano effetti benefici sull'uomo attraverso attività antiossidante, antimicrobica, prebiotica e antiipertensiva (Vhangani e Van Wyk, 2016; Wang *et al.*, 2011). Quando l'aglio fresco viene trasformato in aglio nero, il contenuto totale di melanoidine aumenta significativamente con un concomitante aumento dell'imbrunimento. Toledano Medina e colleghi (2016) hanno dimostrato che la lavorazione dell'aglio a 72, 75, o 78°C per un periodo di tempo ha portato a un aumento d'imbrunimento e che l'intensità e il tasso di imbrunimento dipendono fortemente dalla temperatura e dal tempo di trattamento termico. Bae e colleghi (2014) hanno osservato un rapido aumento dell'intensità di imbrunimento fino a raggiungere un plateau al quindicesimo giorno per i campioni di aglio fresco trattati a 85°C misurando l'assorbimento a 420 nm, mentre il trattamento dei campioni di aglio a 40-70°C ha causato cambiamenti molto più lenti nell'intensità del colore (0,69 per 40°C, mentre 2,05 per 85°C, dopo 45 giorni). Il grado di imbrunimento è stato associato alla reazione di Maillard e l'assorbimento a 280, 320-360 e 420-450 nm corrispondeva ai prodotti formati nella fase iniziale (condensazione zucchero-ammina e riarrangiamento di Amadori), nella fase intermedia (disidratazione dello zucchero, frammentazione e degradazione di Strecker) e nella fase finale (condensazione aldolica, polimerizzazione e formazione di composti nitro eterociclici) della reazione di Maillard. Nursten (2005) e Kang (2016) hanno osservato che i prodotti ottenuti nelle tre fasi seguivano tendenze simili, con un gran numero di prodotti intermedi, insieme a composti come proteine degradate, peptidi e acidi fenolici. L'aumento delle melanoidine porta gradualmente all'inbrunimento dei campioni di aglio fino a un colore marrone scuro o nero. La velocità della reazione di imbrunimento dell'aglio è strettamente

associata alla temperatura di riscaldamento e all'umidità relativa (Rapusas e Driscoll, 1995). Un tasso di imbrunimento più elevato a una temperatura più alta è dovuto principalmente all'aumento e al numero di collisioni tra le molecole (Bae *et al.*, 2014). Considerando la probabilità e la frequenza di diffusione e collisione tra i reagenti, così come la concentrazione di acqua come reagente, un'umidità relativa più elevata per il trattamento termico dell'aglio determina una velocità di imbrunimento più lenta e un'intensità di imbrunimento più bassa in aglio nero (Bae *et al.*, 2014; Fang, 2017; Van Boekel, 2001). Un contenuto più elevato di melanoidine potrebbe modificare notevolmente le proprietà fisiche e chimiche dell'aglio nero, tra cui miglioramento dell'aroma e della consistenza (Hofmann e Schieberle, 2002). Tre tipi di melanoidine con diverse strutture e meccanismi di formazione sono stati riportati sulla base di studi utilizzando alcuni substrati (Cämmerer e Kroh, 1995; Hofmann, 1998; Tressl *et al.*, 1998), suggerirono che le melanoidine fossero polimeri composti da unità ripetute di furani e/o pirroli prodotte durante gli ultimi stadi della reazione di Maillard attraverso la policondensazione. Cämmerer e Kroh (1995) e Cämmerer (2002) hanno ipotizzato che gli scheletri delle melanoidine a base di carboidrati derivino dai prodotti di degradazione dei carboidrati che si verificano nelle prime fasi della reazione di Maillard, come furani e pirroli, e che siano polimerizzati attraverso una condensazione di tipo aldol con composti amminici. È stato proposto che le melanoidine colorate ad alta potenza potrebbero anche essere formate attraverso la reticolazione delle sostanze colorate a bassa potenza con le proteine tramite gruppi α -amminici di lisina o arginina (Hofmann, 1998). Tuttavia, le strutture delle melanoidine sono estremamente complesse in sistemi ibridi e sofisticati, con almeno tre strutture diverse che coesistono.

I composti di Heyns, N-sostituiti 2-ammino-2-deossialdosi, sono prodotti attraverso la reazione di Maillard tra fruttosio e gli amminoacidi, mentre gli N-sostituiti 1-ammino-1-deossi-chetosi (composti di Amadori), se il composto carbonilico è il glucosio (Mossine *et al.*, 1996; Yaylayan e Sporns, 1987). Sia i composti di Amadori e di Heyns hanno un'importante influenza sulla qualità degli alimenti e sulle caratteristiche sensoriali attraverso le loro interazioni con altri costituenti durante la lavorazione termica. Yuan e colleghi (2018) hanno trovato un evidente aumento della quantità totale dei composti di Amadori e di Heyns derivanti dalle reazioni tra tre importanti aminoacidi (prolina, valina e leucina) e il glucosio/fruttosio durante i primi 70 giorni di riscaldamento, seguiti da una diminuzione causata da un'ulteriore trasformazione in piccole molecole e melanoidine dopo 70 giorni. Il contenuto totale di composti di Amadori era superiore a quello dei composti di Heyns, in quanto gli aldosi hanno una maggiore reattività chimica e reagiscono più velocemente con gli amminoacidi attraverso la reazione di Maillard rispetto ai chetosi. Durante la trasformazione di aglio fresco in aglio nero, vengono prodotte melanoidine, insieme ad alcuni importanti intermedi come tiofene, furano e pirazina (che presentano

rispettivamente aroma di tostato, sapore dolce e caramello, dando all'aglio nero un aroma più intenso e desiderabile) (Huang *et al.*, 1984).

2.10 5-IDROSSIMETIL FURFURALE

Il 5-idrossimetil furfurale (HMF) è un'aldeide aromatica a cinque anelli di carbonio che non è naturalmente presente negli alimenti freschi, ma può formarsi negli alimenti contenenti zucchero durante i trattamenti termici. IL 5-HMF può formarsi per disidratazione catalitica tra gli zuccheri riducenti (come il glucosio o il frumento) e gli amminoacidi durante la reazione di Maillard ad alte temperature, oppure attraverso la degradazione diretta dell'esoso in un ambiente acido. La formazione di 5-HMF negli alimenti dipende fortemente dalle condizioni di lavorazione e conservazione, come temperatura e pH (Lansalot-Matras e Moreau, 2003). Il 5-HMF svolge attività biologiche (Zhao *et al.*, 2013), antitumorali (Severin *et al.*, 2010) e antinfiammatorie (Kim, *et al.*, 2011).

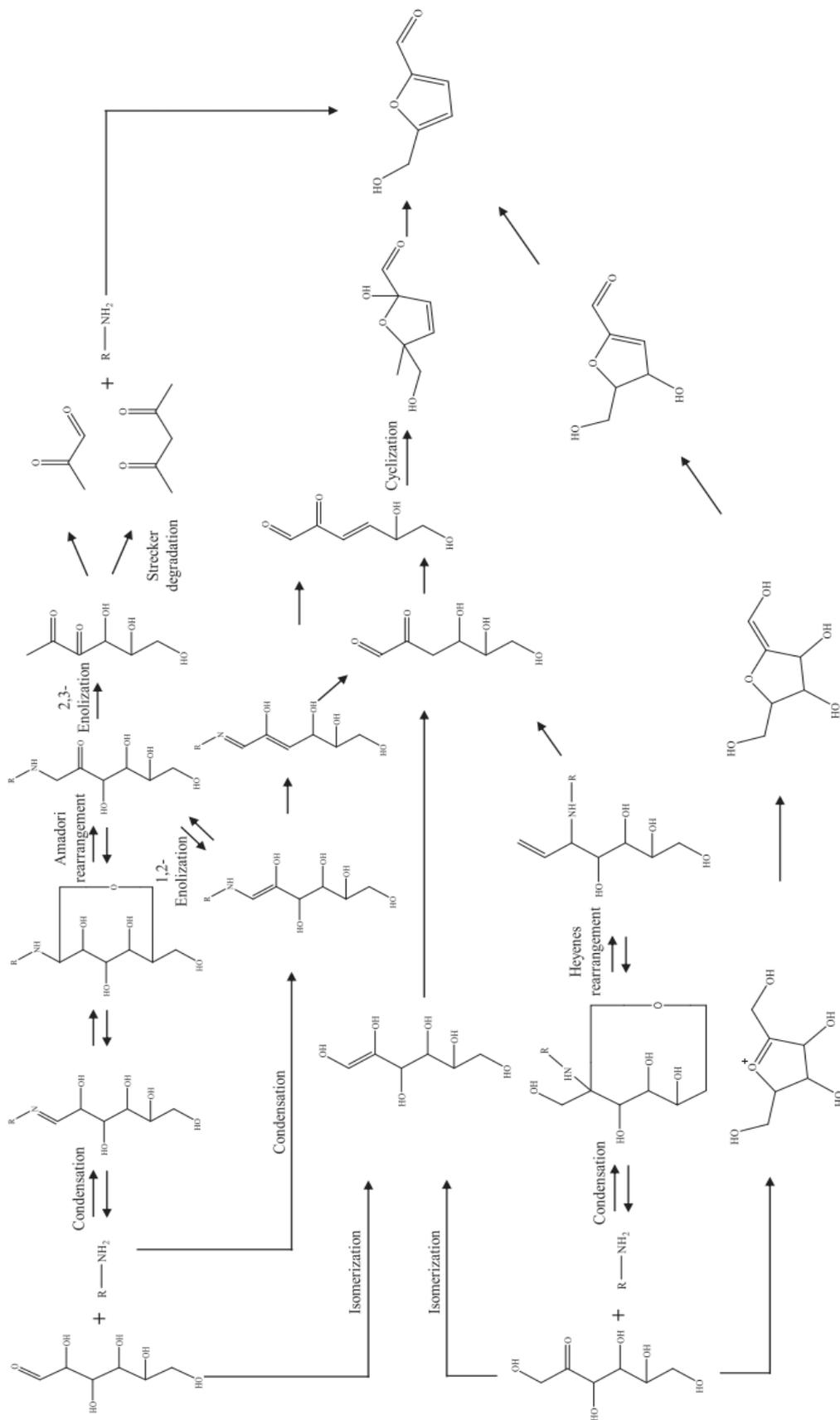


Figura 3: Proposte di reazioni coinvolte nella formazione di 5-idrossimetilfurfurale durante la produzione di aglio nero.

Tuttavia, le preoccupazioni per la sicurezza del 5-HMF non devono essere trascurate (Michail *et al.*, 2007). Il 5-HMF ad alte concentrazioni è citotossico e provoca irritazione ai tessuti e agli organi interni del corpo umano, con mutagenicità e cancerogenicità in vivo (Capuano e Fogliano, 2011; Pastoriza de la Cueva *et al.*, 2017), anche se i risultati delle indagini epidemiologiche non hanno ancora confermato la potenziale associazione del 5-HMF con il rischio di cancro nell'uomo (Abraham *et al.*, 2011). Le autorità di regolamentazione hanno fissato il limite massimo di 5-HMF, come 5-10 mg/L e 25 mg/kg, rispettivamente, nei succhi di frutta e nei concentrati di frutta e 20 mg/kg per i succhi di frutta secondo la Commissione del Codex Alimentarius (Codex Alimentarius, 2000). Come intermedio cruciale nella reazione di Maillard, il 5-HMF influisce non solo sull'attività biologica (uno dei principali antiossidanti nell'aglio nero), ma anche con le caratteristiche sensoriali (con l'amaro a una concentrazione più elevata), e può essere utilizzato come un importante indice di monitoraggio per prevedere il tasso di sviluppo dell'aglio nero (con una stretta correlazione con il tasso di imbrunimento degli alimenti) (Bu *et al.*, 2014). Le analisi tramite ^1H NMR hanno rivelato che nell'aglio fresco non è stato trovato alcun 5-HMF, mentre una grande quantità di 5-HMF viene prodotta durante la trasformazione di aglio fresco in aglio nero, e gli estratti di aglio nero ottenuti dopo 90 giorni di trattamento termico presentano un contenuto di 5-HMF più sei volte superiore rispetto a quello riscaldato per 25 giorni (Liang *et al.*, 2015). Zhang, Li, *et al.* (2016) hanno dimostrato che il livello di 5-HMF nell'aglio nero aumenta notevolmente durante il trattamento termico e l'incremento effettivo dipende dalla temperatura di lavorazione. Un aumento più rapido del contenuto di 5-HMF è stato osservato a una temperatura di lavorazione più elevata. Li e colleghi (2015) hanno riportato che un pretrattamento di congelamento può aumentare il contenuto di 5-HMF in aglio nero del 25% (da 208,5 a 260,7 $\mu\text{g/g}$). Sono state proposte tre vie principali per la formazione del 5-HMF in aglio nero: (a) attraverso l'idrolisi e la ciclizzazione del 3-deossiosone derivato dalla disidratazione e la rimozione del gruppo amminico durante il riarrangiamento nelle posizioni 1, 2 della base di Schiff risultante dalla reazione di Maillard; (b) attraverso la conversione da 3-deossiosone, ottenuto per disidratazione dell'1,2-enediolo derivato dall'isomerizzazione dell'esosio in soluzione; (c) attraverso la conversione da un catione fruttofuranosilico altamente reattivo che viene prodotto da fruttosio e saccarosio (Perez Locas e Yaylayan, 2008). Nella Figura 3 vengono riportate le possibili reazioni coinvolte nella formazione del 5-HMF durante la produzione di aglio nero. Tuttavia, mancano ancora le conoscenze sui reali percorsi di formazione del 5-HMF. Ulteriori studi dovrebbero essere eseguiti per esaminare gli approcci efficienti per monitorare l'importo di 5-HMF durante la trasformazione dell'aglio fresco in aglio nero.

2.11 VITAMINE E MINERALI

L'aglio fresco contiene micronutrienti essenziali per il metabolismo e le funzioni fisiologiche del corpo umano, tra cui molteplici vitamine (circa 0,058% in aglio fresco, come la vitamina C, la vitamina E e la vitamina B1) e vari oligoelementi (circa lo 0,7% nell'aglio fresco come il calcio, il sodio, il magnesio, lo zinco, il germanio e il selenio) (Koch e Lawson, 1996; USDA, 2018). Le vitamine e gli oligoelementi sono noti per le loro numerose attività biologiche (Houston, 2005; Landete, 2013). Pertanto, il consumo regolare di aglio è benefico per la salute umana. La lavorazione dell'aglio fresco a diverse temperature e umidità differenti porterebbe a un aumento del contenuto totale di vitamine idrosolubili da 1,15 a 1,92 volte. (Kim *et al.*, 2013b).

I campioni di aglio trattati a 70°C e 60% di umidità per 60 ore presentavano le più alte concentrazioni di vitamine idrosolubili (11600 mg/kg, rispetto a 6600 mg/kg nell'aglio fresco) (Kim *et al.*, 2013b). Tuttavia, durante la lavorazione termica dell'aglio è stata osservata anche la perdita sostanziale di tiamina (VB1), cobalamina (VB12), acido ascorbico (VC) e biotina (VB7), a causa dell'esposizione prolungata ad acidi, ossigeno, alta temperatura e alta umidità (Kwok *et al.*, 1998). Quando l'aglio fresco viene sottoposto a diversi processi termici, la maggior parte delle vitamine liposolubili diminuisce a causa della loro elevata sensibilità al calore e agli acidi (Ryley e Kajda, 1994) e, di conseguenza, si ha un ridotto contenuto totale di vitamine liposolubili. Al contrario, i contenuti di altre vitamine come acido pantotenico (VB5) e la niacina (VB3) tendono ad aumentare durante il trattamento termico dell'aglio. L'aumento del contenuto di VB3 è probabilmente attribuito al rilascio nelle cellule dell'aglio causato dalla rottura delle membrane cellulari durante il trattamento termico (Ball, 2006). Il VB5 è relativamente stabile e leggermente sensibile al calore, all'ossigeno e alla luce durante la lavorazione. L'aglio contiene anche una serie di minerali (da 0,72% a 0,84% di FM) che sono benefici per l'uomo, contribuendo all'attività antipertensiva e antitumorale, allo sviluppo del sistema immunitario e alla soppressione dell'ossidazione e delle infezioni respiratorie (Houston e Harper, 2008; Rayman, 2012; USDA, 2018). Nell'aglio fresco il potassio è il minerale più abbondante (60,49 mg/g DM), seguito da zolfo (11,38 mg/g DM), magnesio (2,76 mg/g DM), sodio (2,46 mg/g DM) e calcio (1,04 mg/g DM) (Kang, 2016). Kang (2016) ha riscontrato cambiamenti significativi nel contenuto dei minerali dell'aglio in seguito a diversi trattamenti termici; ad esempio il trattamento dell'aglio a 65°C e 50% di umidità relativa per 192 ore genera livelli elevati di zinco, potassio, magnesio, ferro, manganese, fosforo, selenio, rame, sodio, calcio e zolfo, con l'aumento maggiore di selenio (160%), sodio (61,41%), ferro (41,88%) e calcio (24,92%).

2.12 ENZIMI

Gli enzimi presenti nell'aglio fresco sono numerosi e influiscono anche sulla qualità dei prodotti finali di aglio nero. Le superossido dismutasi (SOD) rappresentano probabilmente un gruppo di enzimi unico nell'aglio. Questi enzimi non sono solo importanti scavenger di radicali liberi in un organismo in crescita, ma presentano anche attività biologiche significative, come effetti anti-invecchiamento, di rafforzamento immunitario e di prevenzione delle malattie (Bannister, & Rotilio, 1987; Fridovich, 1975; Sfaxi *et al.*, 2009). Hadji *et al.* (2007) hanno prodotto un estratto grezzo di aglio che conteneva diverse SOD: una Mn-SOD e due Cu, Zn-SOD. Sato e colleghi (2006) hanno anche osservato che l'aglio fresco possedeva un'attività simile alla SOD e un estratto etanolicco all'80% ottenuto dall'aglio fermentato a 60-70°C e con un'umidità relativa compresa tra l'85% e il 95% per 40 giorni ha aumentato di 13 volte l'attività SOD-simile. Una SOD purificata, prodotta dopo l'estrazione con tampone fosfato e cloroformio-etanolo e purificazione tramite precipitazione in acetone seguita da cromatografia a scambio ionico con colonne di dietilaminoetilcellulosa, ha mostrato un'attività enzimatica di 4.124 U/mg di proteina e un tasso di recupero del 53,3% (He, Li, Sun, & Ling, 2008). Inoltre, le SOD nell'aglio sono rimaste stabili a pH da 4 a 11 e da 0 a 50°C (He *et al.*, 2008), anche se la perdita dell'attività della SOD dell'aglio è possibile una perdita dell'attività della SOD dell'aglio a temperature elevate e ad alta umidità.

L'Alliinasi è un enzima caratteristico dell'aglio e appartiene alla classe delle liasi carbonio-zolfo e viene rilasciata quando le cellule vegetali si danneggiano (Kim *et al.*, 2011). La denaturazione dell'alliinasi avviene a una temperatura di 42°C e l'enzima può essere inattivato dopo un riscaldamento a temperature superiori a 60°C per un certo periodo di tempo, impedendo la conversione dell'alliina nell'allicina odorosa (Lagunas & Castaigne, 2008).

La GGT ([5-l-glutamyl]-peptide: aminoacido 5-glutamyltransferasi) è naturalmente presente nei bulbi di aglio e l'andamento della sua attività in funzione della temperatura di conservazione è simile a quello del grado di inverdimento dell'aglio e della concentrazione di tiosolfato nei bulbi d'aglio. (Li, Hu, *et al.*, 2008). La GGT catalizza l'idrolisi dell'elemento Glu, legato in modo univoco all'N-terminale del glutatione ridotto, glutatione ossidato, dai coniugati S del glutatione e da alcuni dipeptidi e tripeptidi contenenti un γ legato all'N-terminale del Glu (Whitfield, 2001). Nell'aglio, la GGT è responsabile del catabolismo del glutatione (Yoshimoto *et al.*, 2015). Di conseguenza, la GGT svolge un ruolo importante nella qualità e nel sapore dei prodotti a base di aglio. Esistono altri enzimi nell'aglio che determinano la qualità dell'aglio. Come molte piante, anche l'aglio contiene enzimi associati al metabolismo degli zuccheri e attività fisiologiche essenziali, come l'amilasi, la saccarosio idrolasi, l'esochinasi e l'invertasi (Atashiv *et al.*, 2011; Bhat e Pattabiraman, 1979), così come enzimi dannosi come la perossidasi e la polifenolossidasi (che possono causare

l'imbrunimento dell'aglio dopo che i bulbi d'aglio sono schiacciati o danneggiati e la degradazione dei composti fenolici benefici per la salute) (Fante e Noreña, 2012). Tuttavia, non è stata trovata nessuna relazione sulla cinetica di questi enzimi e sulle variazioni del loro contenuto durante la trasformazione dell'aglio fresco in aglio nero. Le ricerche future dovrebbero essere indirizzate verso queste aree.

2.13 ENDOFITI DELL'AGLIO

Gli endofiti sono popolazioni microbiche che colonizzano i tessuti interni delle piante sane per almeno una parte del loro ciclo di vita senza causare sintomi esterni apparenti o effetti negativi sul loro ospite, tra cui batteri, funghi e actinomiceti (Ryan *et al.*, 2008). Gli endofiti delle piante hanno attirato molta attenzione, grazie alla loro capacità di produrre una serie di metaboliti secondari bioattivi identici a quelli delle piante ospiti, oltre a una varietà di enzimi extracellulari come amilasi, cellulasi, pectinasi e xilanasi (in particolare ceppi di *Bacillus*) per la fermentazione della frutta (Kim *et al.*, 2007; Krishnan *et al.*, 2012). Alcuni ricercatori ritengono che l'aglio nero si formi attraverso reazioni fisiche e chimiche causate dalla distruzione dei tessuti e delle strutture cellulari dell'aglio in condizioni di alta temperatura e umidità (note come invecchiamento ad alta temperatura) (Liang *et al.*, 2015; Toledano-Medina *et al.*, 2016), ma nella trasformazione si ritiene che ci sia un coinvolgimento anche dei microrganismi endofiti dell'aglio fresco. Nonostante questo, finora esistono solo pochi rapporti sugli endofiti dell'aglio, con pochi studi sul coinvolgimento dei microrganismi nella formazione dell'aglio nero e quale/i ruolo/i i potrebbero svolgere nello sviluppo e nei cambiamenti dei nutrienti e sostanze bioattive durante il trattamento termico dell'aglio. Utilizzando tecniche di biologia molecolare e di sequenziamento next-gen, Jung e colleghi (2012) hanno scoperto che il *Leuconostoc* era il batterio lattico più dominante nei campioni di aglio testati. Sulla base della caratterizzazione fenotipica e dell'analisi filogenetica del gene 16S è stato dimostrato che un certo numero di endofiti dell'aglio è coinvolto nel processo di trasformazione dell'aglio fresco in aglio nero (con *Bacillus subtilis*, *Bacillus methylotrophicus* e *Bacillus amyloliquefaciens* come ceppi dominanti) (Qiu *et al.*, 2018).

La presenza, il tipo e le prestazioni degli endofiti dell'aglio durante la produzione dell'aglio nero sono di grande importanza. Tuttavia, ci sono importanti colli di bottiglia che impediscono un rapido avanzamento in questo campo: limitazioni nella coltivabilità e nella riproducibilità di alcuni batteri sono stati osservati negli approcci basati sulle colture (Rappé & Giovannoni, 2003), e le limitazioni nella capacità delle tecnologie molecolari attualmente in uso di svolgere indagini approfondite sulla diversità microbica e sulla diversità e la distribuzione microbica in campioni di ferro (Wilmes *et al.*, 2008). Studi di metatassonomia batterica hanno permesso di aumentare le conoscenze sulla

comunità microbica (compresi gli endofiti dell'aglio). La comunità microbica coinvolta nella produzione dell'aglio nero era composta da 45 phyla e 1125 generi distinti, con *Thermus*, *Corynebacterium*, *Streptococcus* e *Brevundimonas* considerati i generi più dominanti (Qiu *et al.*, 2018). Gli endofiti batterici dell'aglio possono fermentare il glucosio, lattosio, saccarosio e il polisaccaride dell'aglio; mostrano una forte resistenza al calore e producono quantità significative di acidi organici e sostanze bioattive (come i polisaccaridi extracellulari che sono importanti per il sapore distinto, la conservabilità e la bioattività dei prodotti finali a base di aglio) (Qiu *et al.*, 2018; Yuan *et al.*, 2009).

3. VALORE NUTRIZIONALE E ATTIVITA' BIOLOGICA DELL'AGLIO NERO

L'aglio fresco è stato a lungo considerato un alimento medicinale con proprietà antibatteriche, antivirali, antidiabetiche, antiossidanti, antinfiammatorie, antiipertensivo, cardioprotettivo, ipolipemizzante e effetti positivi sul sistema immunitario grazie al suo elevato contenuto in composti organici dello zolfo (Bayan *et al.*, 2014). La trasformazione di aglio fresco in aglio nero induce alterazioni nelle attività biologiche a causa di cambiamenti nei composti bioattivi, per esempio, l'aumento delle attività antiossidanti (Jeong *et al.*, 2016; Kim, Nam, *et al.*, 2012), ma anche una ridotta attività immunomodulante dell'aglio nero rispetto all'aglio fresco (Li *et al.*, 2017).

3.1 ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE

L'attività antiossidante è la caratteristica più evidente dell'aglio nero. Gli studi in vitro hanno rivelato che l'aglio nero possiede un'elevata attività di scavenging dei radicali DPPH, radicale ABTS, radicale idrossile, radicale nitrito e anione superossido, potere antiossidante riducente ferrico e capacità antiossidante equivalente al trolox, Jung e Sohn, 2014; Kim, Nam, *et al.* 2012; Lee *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2015). È stato inoltre riscontrato che l'aglio nero inibisce fortemente la perossidazione lipidica (perossidazione dell'acido linoleico) e la produzione di radicali liberi (capacità di chelare il Fe²⁺) (Bae *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2012; Sato, Kohno *et al.*, 2006). Lee e colleghi (2009) hanno riportato che rispetto al gruppo di aglio fresco e al gruppo di controllo, il consumo di aglio nero invecchiato ha determinato una diminuzione significativa delle sostanze reattive dell'acido tiobarbiturico (TBARS) a livello epatico nei topi di laboratorio, aumentando al contempo le attività degli enzimi antiossidanti (tra cui glutatione perossidasi). Inoltre, l'aglio nero (142,37 µM/g) può proteggere efficacemente la pelle dal fotodanneggiamento indotto dagli ultravioletti B nei topi, diminuendo in modo significativo la perossidazione lipidica (Kim *et al.*, 2012). L'aumento dell'attività antiossidante è strettamente associata alla produzione di nuovi

composti antiossidanti e all'aumento delle quantità di alcuni potenti antiossidanti durante il processo di trasformazione dell'aglio fresco a aglio nero, come SAC, polifenoli (inclusi i flavonoidi), \square derivati delle carboline, melanoidine, composti di Amadori e Heyns composti, 5-HMF, N-alfa-(1-deossi-D-fruttos-1-il)-larginina (Ryu *et al.*, 2001) e piruvato, nonché i composti attivi conservati dopo il trattamento termico, tra cui i composti organici dello zolfo, vitamine e alcuni minerali.

3.2 ATTIVITÀ ANTICANCRO

L'aglio nero mostra eccellenti effetti terapeutici in vitro e in vivo su diversi tipi di cancro (cancro del polmone, del fegato, gastrico, leucemia, mammella e colon). Un estratto in esano dell'aglio nero invecchiato ha mostrato effetti antitumorali in cellule leucemiche umane U937, in quanto l'estratto induce apoptosi caspasi-dipendente (Park *et al.*, 2014). L'aglio nero invecchiato è stato capace di inibire la crescita delle cellule tumorali del colon HT29 e di promuovere la loro apoptosi (Dong *et al.*, 2014). I trattamenti con gli estratti di aglio nero invecchiato sono risultati in grado di indurre apoptosi dose-dipendente di cellule di cancro gastrico umano SGC-7901 in vitro e inibire la crescita (volume e peso) di tumori inoculati in topi in vivo (Wang *et al.*, 2012). Nelle cellule di carcinoma gastrico umano, l'aglio nero ha anche dimostrato possedere effetti inibitori sulla motilità e sull'invasività cellulare (Shin *et al.*, 2010).

3.3 ATTIVITÀ ANTI OBESITÀ

L'obesità è oggi considerata una delle principali problematiche per la salute umana (Kopelman, 2000). È stato riscontrato che la somministrazione di aglio nero invecchiato allevia una serie di sintomi causati da fattori genetici o da diete ad alto contenuto di grassi (HFD). Il supplemento di aglio nero ha ridotto significativamente il colesterolo totale e i trigliceridi nel siero del 10,46% e del 14,93%, rispettivamente in topi di laboratorio (Seo *et al.*, 2009). L'aglio nero potrebbe diminuire il peso corporeo finale, la massa relativa del fegato e dei tessuti grassi, l'accumulo di lipidi epatici e i livelli di trigliceridi nel siero di ratti alimentati con HFD (Chen *et al.*, 2014). Nei ratti di Sprague Dawley alimentati con HFD o nei pazienti con ipercolesterolemia lieve, l'aglio nero potrebbe aumentare il contenuto di lipidi totali e dei trigliceridi e il livello di colesterolo delle lipoproteine ad alta densità (Ha *et al.*, 2015; Jung *et al.*, 2014). L'integrazione dell'estratto di aglio nero può anche contribuire alla regolazione del glucosio nel sangue e alla prevenzione dell'iperglicemia. Nei ratti diabetici indotti da streptozotocina, sono state osservate riduzioni significative dei livelli di glucosio nel sangue e di emoglobina glicosilata, e un miglioramento del metabolismo lipidico, sono stati

indotti dal trattamento con una polvere di estratto di aglio nero (Kang *et al.*, 2013). In modelli di ratto o di topo, la somministrazione di estratto di aglio nero è risultata in grado di abbassare i livelli inizialmente elevati di glucosio nel sangue a digiuno e di emoglobina glicata nel sangue attraverso l'aumento della sensibilità all'insulina e del livello di insulina plasmatica (Ha *et al.*, 2015; Seo *et al.*, 2009).

3.4 ATTIVITÀ ANTIINFIAMMATORIA

L'aglio nero ha dimostrato una forte attività antinfiammatoria perché è ricco di agenti antinfiammatori, come i composti organici dello zolfo, polifenoli, alcaloidi, 5-HMF, melanoidine, polisaccaridi e 2-linoleoilglicerolo. Il 2-linoleoilglicerolo isolato dall'aglio nero è risultato in grado di ridurre i livelli di NO, prostaglandina E2 (PG-E2), e di mediatori infiammatori (IL-6, IL-1 α e fattore di necrosi tumorale [TNF]- α), nonché l'espressione dell'ossido nitrico sintetasi inducibile (iNOS) e della ciclossigenasi-2 (COX-2) in modelli cellulari in stato infiammatorio (Kim *et al.*, 2017). Kim e colleghi (2011) hanno riportato che il 5-HMF isolato e purificato dall'aglio nero invecchiato potrebbe contribuire alla prevenzione e al trattamento delle malattie vascolari attraverso la funzione antinfiammatoria, inibendo in modo significativo l'espressione del TNF- α indotto e l'espressione di proteine di adesione intercellulari, la formazione di specie reattive dell'ossigeno indotte dal TNF- α , e altre funzioni in modelli cellulari umani (Kim *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011). In vitro, gli estratti di aglio nero invecchiato hanno anche inibito la proliferazione cellulare e la progressione del ciclo cellulare nelle cellule TNF- α attivate da cellule stromali endometriali umane attraverso la sotto-regolazione dell'espressione di ICAM-1 e VCAM-1 e la secrezione di IL-6 (Kim *et al.*, 2013). Gli estratti di aglio nero invecchiato hanno protetto i topi di laboratorio dallo shock letale indotto da LPS riducendo in modo significativo i livelli di TNF- α e IL-6 nel siero (Kim *et al.*, 2014).

3.5 ATTIVITÀ IMMUNOSTIMOLANTE

L'attività immunostimolante svolge un ruolo importante nella prevenzione e nel recupero di varie malattie. Alcune linee cellulari e modelli animali sono stati utilizzati per studiare le proprietà immunostimolanti dell'estratto di aglio nero. Il trattamento con 70% di estratti etanolic di aglio nero ha portato ad un aumento del livello di proliferazione cellulare in tutti i linfociti B o linfociti T (Purev *et al.*, 2012). L'aumento del livello di proteina TNF- α rilasciata e la produzione di NO nei campioni di macrofagi hanno ulteriormente confermato l'attività immunostimolante dell'aglio nero nei linfociti primari e nei macrofagi umani (Purev *et al.*, 2012). Feng e colleghi (2010) hanno

valutato i benefici farmacologici degli estratti di aglio nero nei topi BALB/c e hanno scoperto che gli estratti di aglio nero aumentavano in modo significativo la citotossicità delle cellule killer naturali e hanno promosso i livelli di secrezione di NO e di citotossine TH1 IL-2, TNF- α e TNF- β .

3.6 ATTIVITÀ ANTIALLERGICA

Esistono diverse risposte allergiche, che sono influenzate da fattori genetici e ambientali. Negli ultimi anni, il numero di pazienti allergici è in aumento, per cui gli alimenti funzionali con effetti antiallergici sono molto richiesti. Kim e colleghi (2012) hanno dimostrato che gli estratti ottenuti da etanolo al 70% da bulbi dell'aglio fresco e aglio nero invecchiato hanno mostrato proprietà antiallergiche in modelli epatici cellulari inibendo il rilascio della β -esosaminidasi (Kim *et al.*, 2012). Yoo e colleghi (2014) hanno studiato l'azione antiallergica dell'aglio nero invecchiato esaminando gli effetti dell'acetato di etile dell'aglio nero invecchiato sulle risposte allergiche mediate dalle immunoglobuline E (IgE). In vivo, una frazione attiva dell'estratto di acetato di etile di aglio nero invecchiato ha ridotto differenti reazioni di anafilassi cutanea in topi a seconda della dose applicata. Rispetto all'estratto di aglio fresco, l'estratto di aglio nero invecchiato risultava avere una minore citotossicità e un maggiore effetto inibitorio, e agisce quindi come un agente sicuro ed efficace per combattere la risposta allergica (Kim *et al.*, 2011).

3.7 ATTIVITÀ EPATOPROTETTIVA E CARDIOPROTETTIVA

L'aglio nero presenta attività antiossidanti e antinfiammatorie in vitro e in vivo superiori a quelle dell'aglio fresco. Di conseguenza, l'aglio nero eserciterebbe un effetto protettivo per il fegato e il cuore. Nei ratti Sprague-Dawley con lesioni croniche indotte da alcol etilico, è stato riscontrato che la somministrazione di aglio nero invecchiato aveva un effetto epatoprotettivo, basato sul miglioramento dei profili lipidici e sulla riduzione significativa dei marcatori plasmatici della funzione epatica e del danno: i livelli di aspartato amino-transferasi (AST), alanina aminotransferasi (ALT), fosfatasi alcalina e lattato deidrogenasi sono stati ridotti dalla fosfatasi e lattato deidrogenasi si sono ridotte rispettivamente del 38,7%, 27,3%, 20,4% e 14,7% (Kim, *et al.*, 2011). Questi effetti terapeutici dell'aglio nero sono dovuti all'inibizione dell'attività del citocromo e riduzione della perossidazione lipidica o del danno ossidativo al DNA (Kim, *et al.*, 2011). Shin e colleghi (2014) hanno dimostrato che il trattamento con aglio nero invecchiato esercita una protezione sul fegato dei ratti. Risultati sperimentali simili sono stati ottenuti anche in topi con danno epatico indotto da una dieta ad alto contenuto di grassi (Shin *et al.*, 2014). Inoltre, l'aglio nero con abbondanza di SAC e polifenoli può esercitare una funzione cardioprotettiva inducendo un effetto rilassante sulle arterie

coronariche, probabilmente grazie al potenziamento delle prestazioni antiossidanti nel cuore (García-Villalón *et al.*, 2016).

3.8 ALTRI EFFETTI BIOLOGICI

Recentemente è stato riscontrato anche un effetto benefico dell'aglio nero sulla memoria e sul sistema nervoso, inoltre, riduce lo stress ossidativo e gli effetti della sbornia (Hermawati *et al.*, 2015; Yang, 2010). La somministrazione di estratti etanolici al 70% di aglio nero invecchiato ha portato a un miglioramento significativo della funzione della memoria spaziale e a un aumento significativo del numero totale di neuroni piramidali nella regione CA1 dell'ippocampo (Hermawati *et al.*, 2015) e delle cellule di Purkinje della cerebella in ratti Wistar trattati con glutammato monosodico (Aminuddin *et al.*, 2015). L'abilità di una frazione di acetato di etile di aglio nero invecchiato di inibire la protrombina, i fattori di coagulazione del sangue e l'aggregazione piastrinica suggeriscono una significativa attività antitrombotica (Jung e Sohn, 2014). L'integrazione di aglio nero potrebbe diminuire lo stress ossidativo attraverso la regolazione del livello di espressione delle proteine da shock termico 70 e riducendo il livello di TBARS epatico nei ratti sottoposti a esercizio fisico ad alta intensità (Baek *et al.*, 2012) e può alleviare gli effetti della sbornia indotta dall'etanolo nei ratti (Yang, 2010).

Sebbene numerosi studi abbiano dimostrato le attività fisiologiche dell'aglio nero o dei prodotti derivati, le sostanze attive specifiche responsabili degli effetti benefici e i meccanismi sottostanti non sono ancora noti. Inoltre, le potenziali interazioni sinergiche tra i componenti caratteristici dell'aglio nero e l'attività biologica rilevata rimangono poco studiate. Sono necessarie ulteriori indagini per caratterizzare il contributo dei singoli composti bioattivi nell'aglio nero e le loro interazioni.

4. PROCESSI PER TRASFORMARE L'AGLIO FRESCO IN AGLIO NERO

4.1 FATTORI CHE INFLUENZANO LA QUALITÀ DELL'AGLIO NERO

Come descritto in precedenza, l'aglio nero è un ottenuto dalla trasformazione dall'aglio fresco attraverso un processo ad alta temperatura e umidità, che ne comporta il cambiamento strutturale, fisiologico e chimico. La Tabella 2 riassume le sostanze desiderate e indesiderate presenti nell'aglio nero. Inoltre, la panoramica degli studi precedenti conferma che la qualità dei vari tipi di aglio nero dipende in larga misura dal processo di produzione (temperatura, umidità e tempo, pH della matrice e mezzo solvente, presenza di ossigeno e suo livello e presenza di pretrattamenti), oltre che dai tipi

e dalle caratteristiche di aglio fresco. I principali fattori di influenza sono riassunti nella Figura 4 e alcuni di essi saranno discussi di seguito.

4.1.1 EFFETTI DOVUTI ALLA MATERIA PRIMA

La composizione dei nutrienti dell'aglio varia tra le diverse varietà e dipende anche dal luogo in cui l'aglio cresce. La composizione nutritiva dell'aglio influenza direttamente il processo di formazione e la qualità dell'aglio nero (Wang *et al.*, 2016). Zhao (2017) ha riportato le differenze significative ($p < 0.05$) nei contenuti di zuccheri solubili, proteine solubili, allicina, selenio e germanio tra 58 bulbi d'aglio raccolti da diverse aree di produzione in Cina. Inoltre, si è riscontrato che la separazione degli spicchi d'aglio influisce sulle proprietà dell'aglio nero ed è correlata positivamente con la sua capacità antiossidante (Tran *et al.*, 2018). La Tabella 3 mette a confronto la composizione e l'attività antiossidante di prodotti aglio fresco e aglio nero realizzati con aglio fresco a uno o più spicchi. Dopo che l'aglio è stato trasformato in aglio nero, è stato riscontrato che l'aglio nero ha un solo spicchio ha contenuti significativamente più elevati di zuccheri totali, aliina, sostanze polifenoliche e S-allilcisteina, nonché di attività antiossidante (comprese le attività di rimozione dei radicali ABTS, DPPH e superossido), rispetto all'aglio nero a più spicchi (Wang *et al.*, 2016).

4.1.2 PRETRATTAMENTO DELL'AGLIO FRESCO

I trattamenti che precedono la trasformazione termica dell'aglio fresco in aglio nero sono definiti "pretrattamenti" e si è riscontrato che influiscono sulle proprietà dei prodotti dell'aglio nero finali. I pretrattamenti possono distruggere le strutture cellulari dell'aglio, permettendo il contatto diretto e le successive reazioni tra i componenti cellulari e i fattori ambientali durante il processo di trasformazione. Nelle stesse condizioni di fermentazione, gli spicchi sbucciati di aglio nero hanno un'attività antiossidante superiore a quella dei bulbi dell'aglio nero non sbucciati (Toledano-Medina *et al.*, 2016). Li *et al.* (2015) hanno riportato che il tempo di congelamento ottimizzato (30 ore) potrebbe accelerare in modo significativo la velocità di imbrunimento dell'aglio nero, ridurre i tempi di lavorazione (da 60-90 giorni a 22 giorni), aumentare il tempo di lavorazione (da 60-90 giorni a 22 giorni) e aumentare il contenuto di zuccheri riducenti, fenoli totali e 5-HMF (del 51,88% e del 58,54% e 25%, rispettivamente), mentre diminuisce il contenuto di amino-N del 50,97%. Il pretrattamento di congelamento ha facilitato l'idrolisi dei fruttani nell'aglio, il rilascio di fenoli legati (cioè, fenoli in forma esterificata e glicosilata) e le reazioni tra le diverse sostanze. Inoltre, Zhong e colleghi (2014) hanno riportato che un 15 minuti di pretrattamento dell'aglio fresco con

l'uso di un'altissima pressione potrebbe avere un impatto significativo sul contenuto di nutrienti e sull'attività antiossidante (compresi il potere riducente e la capacità di scavenging dei radicali idrossilici) dell'aglio nero. Il rilascio di antiossidanti come i polifenoli e cambiamenti nella struttura delle sostanze macromolecolari sono stati possibili dopo la rottura delle cellule di aglio sotto la sinergia di alta pressione e alta temperatura.

4.1.3 TEMPERATURA DI LAVORAZIONE

Tra i fattori che influenzano la qualità dell'aglio nero, la temperatura del trattamento termico durante la produzione dell'aglio nero è una delle variabili più importanti. Zhang e colleghi (2016) hanno riportato gli effetti significativamente ($p < 0.05$) diversi delle temperature di lavorazione (60, 70, 80 e 90°C) sulla qualità degli agli neri (come riassunto nella Tabella 4). Una temperatura più elevata ha comportato un tasso di imbrunimento più rapido e una perdita di umidità e allicina, fenoli totali e acidi totali. In particolare, 70°C sembrava essere la temperatura più favorevole tra quelle da loro esaminate, che ha portato gli attributi sensoriali più desiderabili (colore nero uniforme, moderatamente umido, con una consistenza elastica e masticabile e un sapore agrodolce) e il più alto contenuto di zuccheri riducenti, con contenuti adeguati di HMF e acidi totali.

Bae e colleghi (2014) hanno riscontrato che l'aumento della temperatura di lavorazione da 40 a 85°C ha comportato un aumento significativo dell'attività antiossidante dell'aglio nero (capacità di scavenging del radicale DPPH e potere riducente: 22,5% e 1,90 per l'aglio nero ottenuto a 40°C; 44,77% e 3,13 per l'aglio nero ottenuto a 85°C; 6,21% e 0,08 per l'aglio fresco). (Bae *et al.*, 2014). La temperatura di lavorazione può influenzare il contenuto di umidità, l'attività degli enzimi, i tassi di reazioni chimiche e i cambiamenti fisici di un alimento. Per la produzione di aglio nero la temperatura di lavorazione è strettamente associata alla perdita di acqua, all'attività degli enzimi intrinseci dell'aglio e ai tassi delle reazioni chimiche che coinvolgono l'intera gamma di prodotti, e ai tassi delle reazioni chimiche che coinvolgono l'intera gamma di componenti dell'aglio.

In particolare, la temperatura di lavorazione regola la velocità e i partecipanti/contribuenti della reazione di imbrunimento non enzimatico (che è strettamente associata alla formazione del colore scuro e al contenuto di acidi organici, polifenoli, melanoidina e 5-HMF) (Rapusas & Driscoll, 1995).

Tabella 2: Sostanze intrinseche desiderate e indesiderate nell'aglio nero.

Sostanze desiderate da potenziare		Sostanze indesiderate da ridurre	
Specie	Motivo	Specie	Motivo
Glucosio e fruttosio	Conferiscono una piacevole dolcezza (Chadwick,	Allicina	Impartiscono un sapore pungente (Kim, Kim,

	Gawthrop, Michelmore, Wagstaff, & Methven, 2016)		Kim, Noh, & Choi, 2014)
Acidi organici	Conferiscono una piacevole asprezza (Huang, Maruyama, Stimac, & Roper, 2008); modulate intestinal microflora populations (Li, Yi, <i>et al.</i> , 2008)	Prodotti finali della perossidazione	Danneggiano il DNA (Marnett, 2002)
Aminoacidi	Essere essenziale per la crescita e il metabolismo (Millward, Layman, Tomé, & Schaafsma, 2008)	Benzopirene	Causano off-odor; alterano la metilazione del DNA metilazione e la crescita delle cellule di cellule tumorali (Sadikovic & Rodenhiser, 2006)
Furano, tiofene e pirazina	Conferire aromi desiderabili (Alasalvar, Shahidi, & Cadwallader, 2003; Baker <i>et al.</i> , 2006)	Amine eterocicliche	causano il cancro al seno (Felton, Knize, Salmon, Malfatti, & Kulp, 2002)
Fruttooligosaccaride	Regolare la flora intestinale (Costalos, Kapiki, Apostolou, & Papatoma, 2008)	5-HMF	Impartiscono un'amarezza indesiderata (alte concentrazioni causano concentrazioni causano citotossicità e attività cancerogena) (Capuano & Fogliano, 2011)
Polifenoli	Agiscono come antiossidanti (Bozin <i>et al.</i> , 2008)	Acrilammide	Causa mutageni per le cellule germinali e cancerogeno (Capuano & Fogliano, 2011)
Melanoidine	(Wang, Qian, <i>et al.</i> , 2011)	Alliina liasi	Causare allergenicità (Kao, Hsu, Su, Hor, & Chow, 2004)
Alcaloidi	Presenta proprietà ansiolitiche, antitumorali antiparassitario, antivirale e attività antimicrobiche	Piombo	Essere tossico per il sistema nervoso, ematopoietico, e renale (Flora, Gupta, & Tiwari, 2012)

	(Cao <i>et al.</i> , 2007)		
5-HMF	Mostrano capacità antiossidanti (Zhao <i>et al.</i> , 2013), antitumorale (Severin <i>et al.</i> , 2010), e proprietà antinfiammatorie (Kim, Choi, <i>et al.</i> , 2011)	Clorpirifos	Causano neurotossicità (Levin <i>et al.</i> , 2002)
SODs	Agiscono da antiossidanti (Itoh <i>et al.</i> , 2009)	Ajoene	Mostra citotossicità (Yoo <i>et al.</i> , 2014)
SAC	Mostra antiossidanti (Dairam, Fogel, Daya, & Limson, 2008) e antitumorale (Tsubura, Lai, Kuwata, Uehara, & Yoshizawa, 2011) attività	Melanoidine	Causa genotossicità e citotossicità (Wang, Qian, <i>et al.</i> , 2011)
Vitamina C	Mostra attività antiossidanti e antitumorali attività antitumorali (Eberhardt, Lee, & Liu, 2000)		
Vitamina B12	Prevenire l'anemia pernicioso (Green <i>et al.</i> , 2017)		
Selenium	Presenta proprietà antiossidanti, antinfiammatorio e antitumorale (Rayman, 2012)		

Abbreviazioni: 5-HMF, 5-idrossi metil furfurale; SAC, S-allil-L-cisteina; SOD, superossido dismutasi.

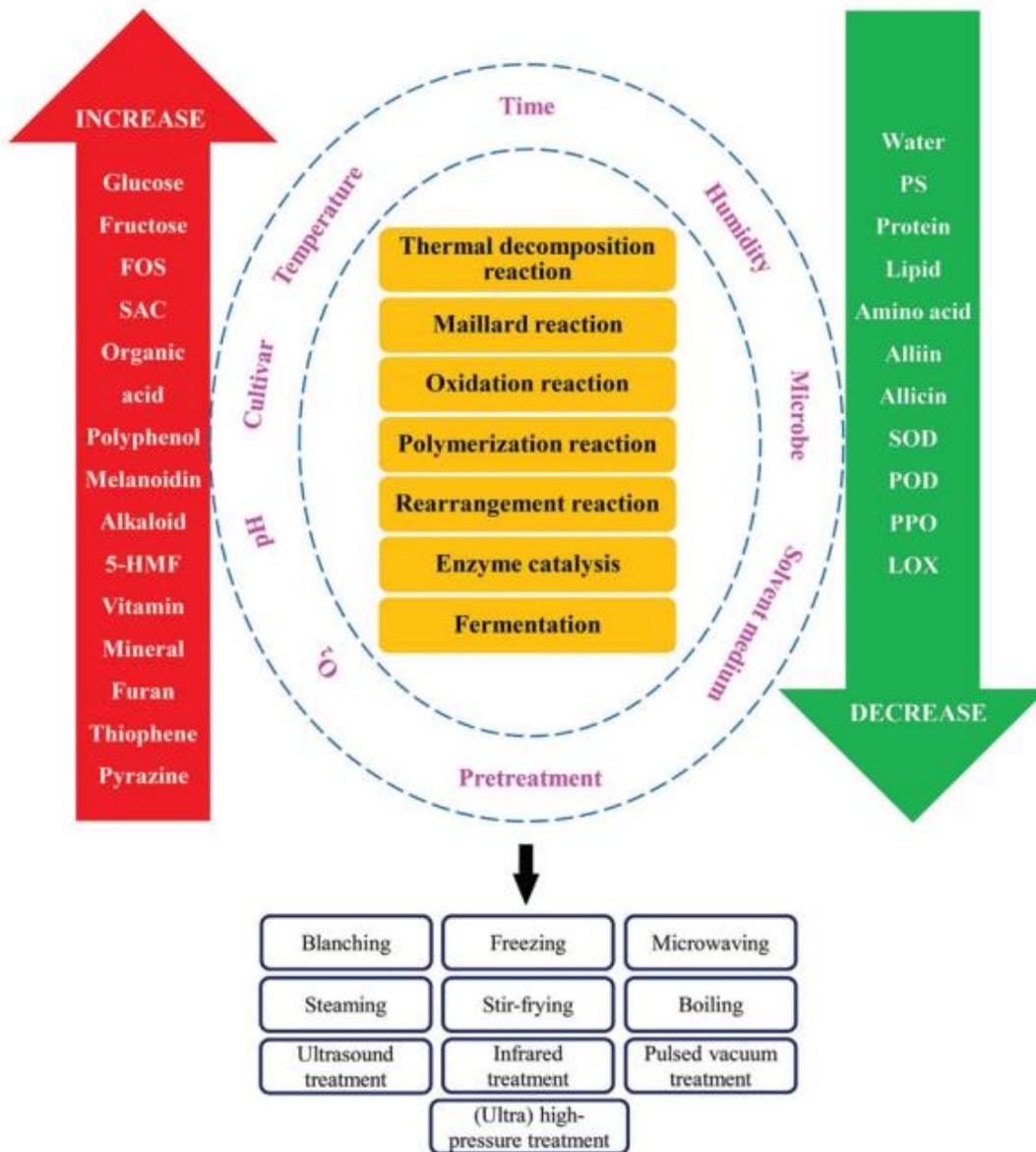


Figura 4: Fattori che influenzano la qualità dell'aglio nero. Abbreviazioni: FOS, frutto-oligosaccaridi; SAC, S-allil-L-cisteina; 5-HMF, 5-idrossi metil furfurale; PS, polisaccaride; SOD, superossido dismutasi; POD, perossidasi; PPO, polifenolo ossidasi; LOX, lipossigenasi.

4.1.4 UMIDITA' DI LAVORAZIONE

È noto che l'umidità di lavorazione influisce notevolmente sull'attività degli enzimi e sulla velocità delle reazioni chimiche e dei cambiamenti fisici di un alimento. L'umidità è un parametro di processo fondamentale per la produzione di aglio nero ed esercita un'influenza sugli attributi sensoriali del prodotto, valore nutrizionale e sull'attività biologica. Fang (2017) ha dimostrato che l'umidità nella lavorazione dell'aglio ha un impatto significativo sul tasso di evaporazione, sul contenuto di umidità trattenuto nell'aglio nero, nonché sull'aspetto (come il grado di imbrunimento) e sulla consistenza dell'aglio. Un'umidità più elevata ha comportato una più lenta velocità di imbrunimento e un prodotto più umido e dolce, con un contenuto di acidi organici inferiore, ma con

un contenuto più elevato di zuccheri riducenti, polifenoli e 5-HMF. Sun e Wang (2018) hanno riferito che 75°C e 85% di umidità relativa potrebbero essere i parametri più adatti per produrre l'aglio nero con una maggiore capacità antiossidante e proprietà sensoriali più desiderabili.

Essi ritengono che l'interazione tra la temperatura di lavorazione e l'umidità sia responsabile dei contenuti di composti funzionali rilevati nell'aglio nero: l'umidità è strettamente associata all'idrolisi delle sostanze macromolecolari e alle reazioni non enzimatiche di imbrunimento ad alte temperature. Un'elevata umidità potrebbe portare a concentrazioni superiori di zuccheri riducenti e fenoli a piccole molecole derivati dai polisaccaridi e polifenoli dell'aglio attraverso l'idrolisi ad alte temperature (Lv, 2010). Inoltre, la velocità della reazione di Maillard è direttamente associata alla Aw, con una più alta umidità (all'interno dell'intervallo analizzato) che porta a un rallentamento della velocità della reazione di Maillard e, di conseguenza, a quantità più elevate di zuccheri riducenti e aminoacidi liberi (Labuza e Saltmarch, 1981)

Tabella 3: Le composizioni e l'attività antiossidante dell'aglio fresco e dei prodotti a base di aglio nero ottenuti con aglio fresco a uno o più spicchi.

Contenuto dei costituenti	Tipi di aglio fresco e aglio nero			
	Spicchio singolo aglio fresco	Spicchio singolo aglio nero	Spicchio multiplo aglio fresco	Spicchio multiplo aglio nero
Zuccheri totali (mg/g)	152.10 ± 9.70	194.20 ± 14.10	83.70 ± 11.40	164.30 ± 14.30
Polifenoli (mg/g)	0.97 ± 0.02	5.63 ± 0.24	0.97 ± 0.02	4.70 ± 0.14
Alliina (mg/g)	3.38 ± 0.04	1.80 ± 0.08	3.18 ± 0.05	1.52 ± 0.05
SAC (mg/g)	1.00 ± 0.06	3.53 ± 0.14	0.90 ± 0.07	3.51 ± 0.23
DPPH RSR (%)	6.90 ± 1.80	61.80 ± 1.50	11.20 ± 1.80	54.10 ± 1.90
ABTS RSR (%)	34.50 ± 1.20	95.00 ± 2.50	29.40 ± 3.70	93.10 ± 1.20
Superossido RSR (%)	9.90 ± 0.40	21.20 ± 1.20	9.90 ± 0.80	20.40 ± 1.10
FRAP	0.80 ± 0.10	16.10 ± 0.20	0.80 ± 0.10	12.40 ± 0.20

Nota: Tutti gli indicatori erano basati sulla materia fresca. I dati sono stati adottati da Wang *et al.* (2016). Abbreviazioni: SAC, S-allil-L-cisteina; SOD, superossido dismutasi; DPPH RSR, 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl free radical scavenging rate; ABTS RSR, 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina 6-solfonato); Superossido RSR, tasso di rimozione del radicale superossido; FRAP, potere antiossidante riducente ferrico.

Tabella 4: Composizioni chimiche di prodotti a base di aglio nero lavorati a diverse temperature

Parametri	Temperature (°C)			
	60	70	80	90
Tempo di maturazione	69 giorni	30 giorni	15 giorni	9 giorni
Intensità di imbrunimento	74.14 ± 0.56a	74.44 ± 0.42a	74.55 ± 0.97a	74.60 ± 0.28a
Umidità (g/kg)	490.23 ± 2.70a	460.61 ± 22.69a	471.19 ± 33.87a	470.84 ± 6.80a
Zuccheri riducenti (g/kg)	335.21 ± 0.45c	357.96 ± 3.44a	348.93 ± 1.21b	154.91 ± 2.19d

Amino-N (g/kg)	3.15 ± 0.04b	3.29 ± 0.04a	1.49 ± 0.04c	1.03 ± 0.04d
HMF (g/kg)	1.88 ± 0.02d	4.32 ± 0.02b	4.82 ± 0.06a	4.08 ± 0.08c
Fenoli totali (g/kg)	13.00 ± 0.09b	12.35 ± 0.13b	15.12 ± 0.36a	13.27 ± 0.87b
Acidi totali (g/kg)	33.61 ± 0.17c	37.50 ± 0.17a	30.96 ± 0.17d	36.37 ± 0.17b
Allicina (g/kg)	0.16 ± 0.07c	0.28 ± 0.07bc	0.93 ± 0.07a	0.41 ± 0.07b
Valutazione sensoriale	28.71 ± 0.44d	39.95 ± 0.31a	35.66 ± 0.46b	29.41 ± 0.41c

Nota. I valori sono medi ± deviazioni standard. Le lettere diverse seguite dai dati (a, b, c e d) nella stessa riga rappresentano differenze significative ($p < .05$). I dati sono stati adottati da Zhang, Li, *et al.* (2016). Abbreviazioni: HMF, idrossimetilfurfurale; Amino-N, azoto aminoacidico.

4.2 INTERAZIONI TRA COMPONENTI DELL'AGLIO NERO

Durante la produzione di aglio nero (temperatura e umidità elevate), si verificano interazioni tra i costituenti attivi, quali zuccheri idrosolubili, aminoacidi, lipidi, polifenoli dei composti organici dello zolfo, vitamine e alcuni ioni minerali ed enzimi, causando cambiamenti drastici nelle proprietà sensoriali e nei profili delle sostanze farmacologiche nel prodotto finale (aglio nero). La reazione di Maillard è un buon esempio, in quanto una varietà di composti attivi può partecipare alla reazione, come reagenti iniziali o intermedi, e in una delle tre fasi (gli stadi iniziale, intermedio e finale sopra descritti). La Figura 5 mostra le possibili interazioni tra i componenti intrinseci dell'aglio nero durante la produzione e lo stoccaggio dello stesso. È anche possibile che le interazioni non avvengano solo tra le sostanze inizialmente presenti (reagenti), ma anche tra i reagenti iniziali e gli intermedi e/o i prodotti finali di questa reazione che coinvolge i reagenti iniziali. Durante la reazione di Maillard si formano una serie di prodotti fondamentali, come pirazine, pirroli, furani e tiofeni. Queste sostanze sono note per essere responsabili dell'aroma e dell'imbrunimento e delle proprietà antiossidanti degli alimenti (Maillard *et al.*, 2007). Le aldeidi generate, tra cui il furfurale, possono continuare a partecipare a reazioni come la condensazione o l'interazione con i composti coesistenti per formare sostanze che influenzano le proprietà sensoriali e biologiche. La tiamina può subire reazioni complesse durante i trattamenti termici per formare furani, pirimidine, tiofene, e composti di zolfo. Questi composti sono sostanze chimicamente e biologicamente attive per varie reazioni, tra cui reazioni di sostituzione estese e reazioni con idroperossidi. Date le condizioni di alta temperatura e umidità per la produzione di aglio nero, i lipidi presenti nei campioni di aglio subiscono indubbiamente ossidazione e idrolisi e producono una serie di sostanze desiderate e indesiderate, che interagirebbero ulteriormente con altre sostanze coesistenti per innescare nuove reazioni e generare una serie di nuovi prodotti che possono influenzare le qualità sensoriali e nutrizionali del prodotto. Ad esempio, interagiscono con composti amminici, composti carbonilici e intermedi della reazione di Maillard per formare una serie di composti eterociclici e catene di

composti contenenti zolfo o azoto (Whitfield e Mottram, 1992). I polifenoli, come l'epicatechina, l'acido caffeico e l'acido clorogenico, sono sensibili alle temperature elevate e possono essere ossidati a chinoni (che vengono polimerizzati in melanoidine (Kutyrev e Moskva, 1991). È opportuno menzionare i potenti antiossidanti che si formano dopo l'invecchiamento naturale dell'aglio: MTCC (1a/b) e MTC di C (2a/b). Si formano attraverso una condensazione chimica Pictet-Spengler tra triptofano e un acido α -oxo (come l'acido piruvico) o aldeidi durante la degradazione dell'alliina e la degradazione di Strecker (Ichikawa *et al.*, 2002, 2006; Wnorowski e Yaylayan, 2000). Pertanto, man mano che il processo di produzione procede, il sistema aglio diventa più complicato e il suo profilo compositivo dipende in larga misura dalle condizioni di lavorazione. In termini di impatto della conservazione, è possibile prevedere che molte reazioni chimiche di cui sopra potrebbero avvenire o continuare durante lo stoccaggio dell'aglio nero (in particolare quando lo stoccaggio avviene in condizioni di caldo), come la reazione di Maillard e l'ossidazione di composti altamente attivi come i polifenoli e gli acidi grassi insaturi. La velocità di queste reazioni dipende molto dalla temperatura di conservazione e dall'umidità ambientale. Purtroppo, le ricerche in questo campo sono molto limitate. Di conseguenza, è necessario effettuare ulteriori studi sulle interazioni tra i costituenti, che cambiano dinamicamente, dell'aglio in diversi contesti di lavorazione e in diverse condizioni di conservazione.

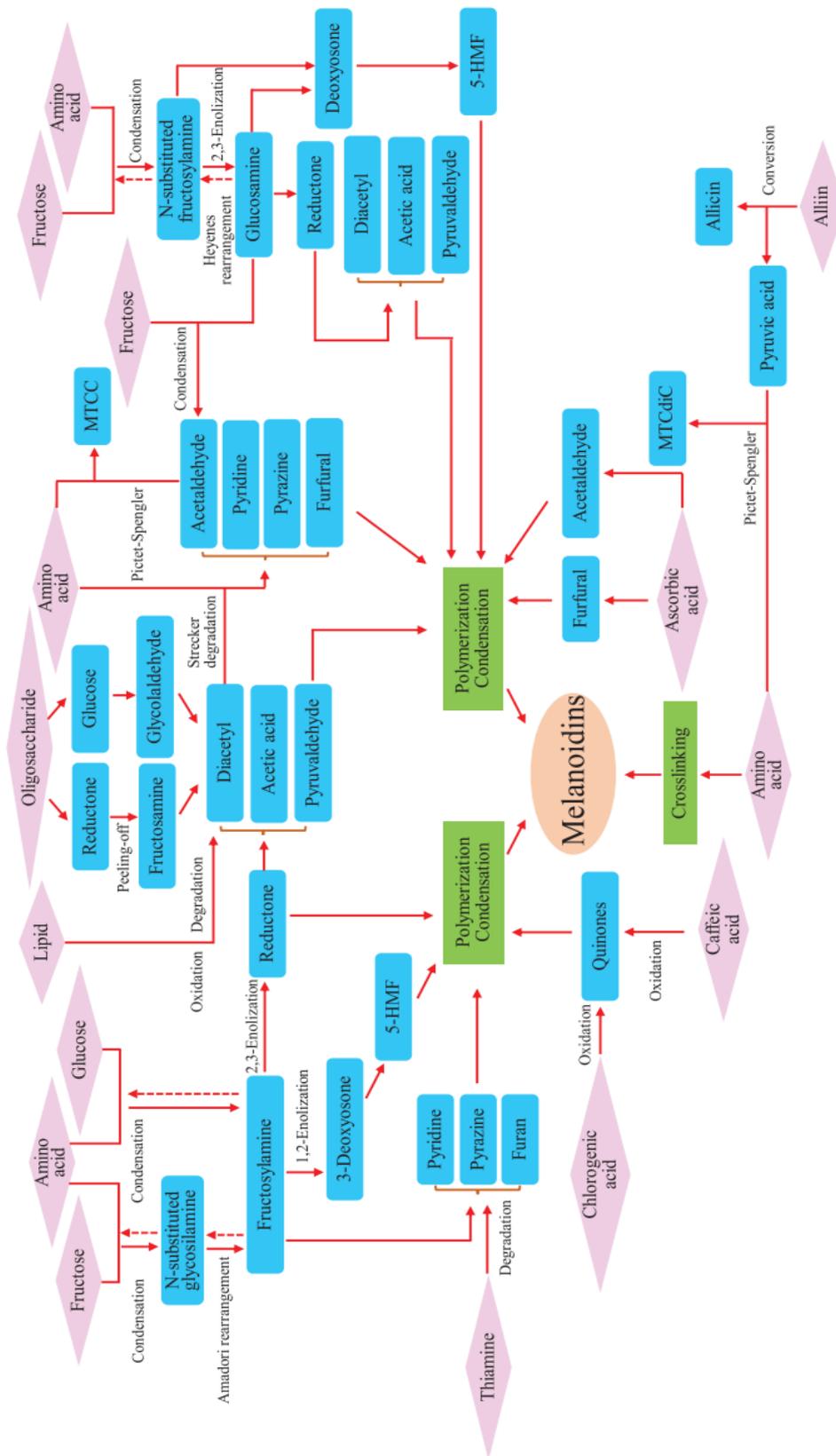


Figura 5. Possibili interazioni tra i componenti intrinseci dell'aglio nero durante la sua produzione e conservazione.

4.3 ATTIVITÀ MICROBIOLOGICA DEI BIOATTIVI DELL'AGLIO NERO

Gli studi basati sulla Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) hanno dimostrato che il metabolismo degli aminoacidi e dei carboidrati, insieme al trasporto di membrana, è la chiave per comprendere il metabolismo microbico e le prestazioni durante la trasformazione dell'aglio fresco in aglio nero (Qiu *et al.*, 2018). I nutrienti e le sostanze bioattive presenti nell'aglio possono partecipare alle vie metaboliche della comunità microbica endofitica ed avere un effetto antimicrobico verso i differenti gruppi microbici, anche associati al benessere del tratto intestinale umano. Queste azioni influenzate dalle condizioni di lavorazione dell'aglio determinano le caratteristiche dei prodotti finali dell'aglio nero. I composti funzionali di nuova generazione (oligosaccaridi, polifenoli, alcaloidi, furfurale e melanoidine) svolgono ruoli diversi nella crescita di microrganismi benefici e dannosi. Un buon esempio sono i fruttani presenti nell'aglio, che possono essere scissi in fruttosio a piccole molecole e FOS. I FOS si comportano come prebiotici e possono esercitare effetti benefici sull'ospite attraverso la stimolazione della crescita e/o dell'attività di uno o più batteri del colon (Chow, 2002). Diversi taxa batterici presenti nell'intestino possono utilizzare gli oligosaccaridi, tra cui membri dei *Firmicutes*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Clostridium* (Pedreschi *et al.*, 2003; Van der Meulen *et al.*, 2006), e in compenso i fruttani possono essere utilizzati e aumentare in modo significativo l'abbondanza relativa di *Actinobacteria*, *Firmicutes* o *Bacteroides* (Sonnenburg *et al.*, 2010). È stato riscontrato che i FOS sopprimono la crescita e la colonizzazione di *Salmonella* (soprattutto quando i FOS sono stati utilizzati come unica fonte di carbonio) (Bailey *et al.*, 1991) e conferiscono significativi effetti antimicrobici (Munoz *et al.*, 2012). Inoltre, i FOS possono promuovere in modo significativo l'attività antimicrobica, come l'attività antibatterica del *Lactobacillus* contro *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Salmonella Enteritidis* (Munoz *et al.*, 2012). Un altro esempio è costituito dagli acidi organici dell'aglio, il cui contenuto totale è risultato aumentare in modo significativo ($p < .05$) durante il trattamento termico (in particolare, acido formico e acido acetico) (Liang *et al.*, 2015). I FOS danno origine ad acidi grassi a catena corta (SCFA), come l'acido formico, l'acido acetico e l'acido propionico, attraverso la fermentazione da parte della microflora intestinale nel colon. È stato riscontrato che gli SCFA possiedono un significativo potere antibatterico contro patogeni di origine alimentare come *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Shigella*, stimolando al contempo la crescita di batteri che favoriscono la salute, come i *Bactobacilli*, *Fusobacterium*, *Lactobacilli* e *Bifidobatteri* (Dubal *et al.*, 2004; In *et al.*, 2013). L'acidificazione citoplasmatica causata dagli SCFA può provocare la deformazione e la distruzione di enzimi, proteine e strutture del DNA e l'accumulo di anioni acidi dissociati potrebbe essere tossico per i batteri patogeni (Taylor *et al.*, 2012). Alcuni acidi organici, come acido citrico e

malico, potrebbero agire attraverso altri meccanismi, tra cui l'effetto chelante o l'intercalazione con la membrana esterna di *Salmonella* (Alakomi *et al.*, 2007; Mani-López *et al.*, 2012). Pertanto, gli SCFA agiscono probabilmente come una "lama a doppio taglio" nei confronti dei microrganismi e gli SCFA nel sistema dell'aglio possono esercitare effetti simili a quelli dei microbi dell'aglio.

Vale la pena parlare delle melanoidine presenti nel sistema aglio, che, come descritto in precedenza, derivano in gran parte dalla reazione di Maillard e contribuiscono in modo significativo al colore, al sapore e all'attività biologica dell'aglio. L'attività antimicrobica delle melanoidine contro diversi batteri patogeni (come il *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* ed *Escherichia coli*) è stata osservata sia in sistemi modello sia in prodotti a base di caffè (Rufián-Henares e Morales, 2008; Rufián-Henares e de la Cueva, 2009). Le melanoidine possono esercitare effetti antibatterici attraverso la chelazione degli ioni metallici essenziali per la crescita e la sopravvivenza dei batteri patogeni, oltre a esercitare un'attività batteriostatica che promuove la distruzione delle membrane cellulari e consente il rilascio di sostanze intracellulari (Rufián-Henares e de la Cueva, 2009). Inoltre, le melanoidine presentano un'attività prebiotica e si comportano come fibre alimentari antiossidanti, che in gran parte sfuggono alla digestione, e foraggiano il microbiota del colon inducendo effetti positivi sulla salute dell'ospite, come è stato studiato per le melanoidine ottenute dal pane (a seconda delle caratteristiche dei materiali e delle condizioni di lavorazione) (Borrelli e Fogliano, 2005). Come discusso in precedenza, nell'aglio esistono diverse vie di generazione delle melanoidine e le melanoidine ottenute variano per struttura chimica e quantità. Pertanto, le interazioni sopra descritte tra i microrganismi e le melanoidine nell'aglio, il tipo e l'entità delle interazioni e delle reazioni associate dipendono dalle caratteristiche dell'aglio e dalle condizioni ambientali. Nel complesso, vi è un'ampia gamma di interazioni tra i composti chiave dell'aglio e i microrganismi coesistenti, ma tali interazioni non sono ancora state studiate a fondo. Sono necessarie ulteriori ricerche su questo aspetto, poiché queste interazioni complicherebbero ulteriormente i cambiamenti compositivi dell'aglio durante la sua trasformazione in aglio nero.

5. MIGLIORAMENTI DEL PROCESSO

La Figura 6 riassume le principali sostanze coinvolte nella formazione dell'aglio nero e le loro possibili variazioni e correlazioni. La produzione dell'aglio nero effettuata in particolari condizioni sembra favorire prodotti con profili sensoriali desiderati. Ad esempio, una delle migliori combinazioni di processo è quella che prevede l'utilizzo di aglio a un solo spicchio (Wang *et al.*, 2016), temperatura moderata (circa 70°C), umidità relativa (circa 80%) (Fang, 2017; Zhang *et al.*,

2016). Inoltre, la qualità di aglio nero ottenuta con la tecnologia di combinazione a temperatura (pre-trattamento ad alta temperatura e post-trattamento a bassa temperatura) sembra superiore.

5.1 FERMENTAZIONE MICROBICA DELL'AGLIO

È possibile personalizzare i profili sensoriali e nutrizionali dei prodotti a base di prodotti dell'aglio nero, manipolando le condizioni di lavorazione per facilitare le reazioni/interazioni desiderate e inibire le reazioni/interazioni che causano la produzione di sostanze indesiderate. Oltre alle variabili di lavorazione sopra menzionate, la fermentazione microbica rappresenta una parte essenziale per l'ottimizzazione della produzione di aglio nero. È stato dimostrato che la fermentazione aumenta l'attività biologica di prodotti naturali salutari come l'aglio nero (Jung *et al.*, 2011; Trinh *et al.*, 2007). Jung e colleghi (2011) hanno scoperto che l'aglio nero fermentato con *Saccharomyces cerevisiae* ha mostrato una maggiore attività antiossidante in vitro e una maggiore attività epatoprotettiva, nefroprotettiva, ipolipemizzante e antiobesità in topi diabetici e obesi, rispetto all'aglio nero invecchiato.

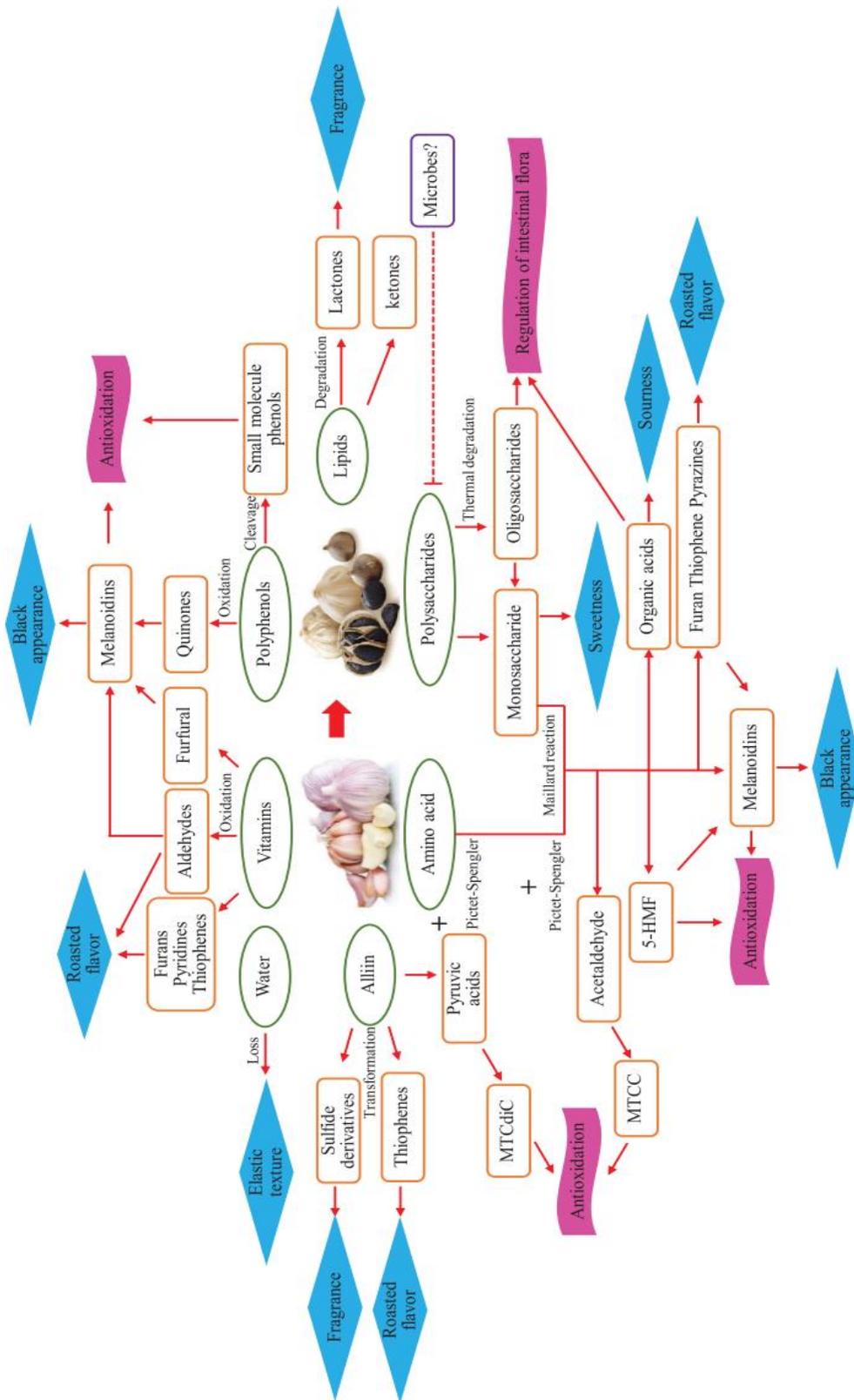


Figura 6: Possibili meccanismi alla base della formazione dell'aglio nero che comportano cambiamenti in una serie di sostanze

Studi precedenti su prodotti fermentati non a base di aglio hanno rivelato che diverse specie di *Bacillus*, come il *Bacillus subtilis*, il *Bacillus aryabhattai* e il *Bacillus coagulans*, possiedono una forte capacità di produrre acidi, e il brodo fermentato con alcune specie di *Bacillus* aveva un sapore distinto (come un sapore e aroma floreale e fruttato), influenzando notevolmente il sapore del prodotto (Yan *et al.*, 2013). Inoltre, le sostanze bioattive, come i lipopeptidi (surfactina, iturina e fengicina), polipeptidi, polieni e polichetidi, possono essere prodotti tramite la fermentazione con alcuni ceppi come il *Bacillus subtilis* e il *Bacillus amyloliquefaciens* (Kudryashova *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2008; Ongena e Jacques, 2008). Queste sostanze bioattive potrebbero migliorare notevolmente il valore nutrizionale del prodotto, inibendo al contempo la crescita di agenti patogeni e/o inibire tumori (Raaijmakers *et al.*, 2010). Poiché sette specie di *Bacillus* sono state isolate da campioni di aglio nero sottoposti a trattamento termico (Qiu, Lu, *et al.*, 2018), si può ipotizzare che l'aglio nero ottenuto mediante fermentazione possa produrre sostanze bioattive e bioattività superiori a quelle dei prodotti fermentati non a base di aglio. Tuttavia, tale ipotesi deve essere dimostrata in un'ampia fermentazione su larga scala con colture per fornire informazioni accurate (a causa della piccola quantità di endofiti nell'aglio). I microrganismi o gli enzimi desiderati e indesiderati per la produzione di aglio nero con vantaggi sensoriali e nutrizionali sono riassunti nella Tabella 5. Sono necessarie prove dirette di ricerca per dimostrare l'importanza di alcuni ceppi per la fermentazione coinvolti nella produzione di aglio nero e il loro impatto benefico o dannoso per l'uomo al livello in cui sono normalmente conservati nell'aglio nero.

5.2 IL DESTINO DEI COMPONENTI DELL'AGLIO NERO DOPO IL CONSUMO

La conoscenza del metabolismo, dell'assorbimento e dell'impatto sulla salute dei componenti dell'aglio nero è di grande importanza. Tuttavia, non sono stati condotti studi sistematici su questo aspetto. Di seguito si riporta una sintesi dei possibili processi di digestione e metabolismo di alcuni composti chiave dell'aglio nero, sulla base dei risultati pubblicati su questi composti isolati o in sistemi alimentari diversi dall'aglio nero. I carboidrati idrosolubili (oligosaccaridi e monosaccaridi) diventano i componenti più dominanti nell'aglio nero. Al momento del consumo dell'aglio nero, il fruttosio viene probabilmente metabolizzato attraverso le vie che coinvolgono il fegato, la corteccia renale e la mucosa intestinale, insieme agli enzimi associati, come la fruttochinasi, l'aldolasi B e la 3-chinasi (Steinmann e Santer, 2012).

Tabella 5: Microrganismi o enzimi desiderati e indesiderati per la produzione di aglio nero con vantaggi sensoriali e nutrizionali.

Microorganismi desiderati/ enzimi da promuovere		Microorganismi indesiderati/ enzimi da eliminare o ridurre	
Specie	Motivo	Specie	Motivo

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (KCTC 7910)	Bioattività contro sindromi come obesità, iperlipidemia, nefropatia nefropatia ed epatopatia (Jung <i>et al.</i> , 2011)	<i>Escherichia coli</i>	Diarrea e malattia (Fleckenstein <i>et al.</i> , 2010)
<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus aryabhattai</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Attività antipertensiva (Park <i>et al.</i> , 2016), produzione di composti volatili e acidi organici (Meng <i>et al.</i> , 2015; Wu & Xu 2012; Yan <i>et al.</i> , 2013), produzione di sostanze bioattive (Kudryashova <i>et al.</i> , 2005; Lee <i>et al.</i> , 2008; Ongena & Jacques, 2008)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Infezione umana (Vuong & Otto, 2002)
<i>Lactobacillus pentosus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	Inibizione dei batteri patogeni (Bernbom, Ng, Paludan-Müller, & Gram, 2009; Paludan-Müller, Valyasevi, Huss, & Gram, 2002)	POD	Generazione di sapori sgradevoli e perdita di nutrienti (Bahçeci, Serpen, Gökmen, & Acar, 2005; Gökmen, Bahçeci, Serpen, & Acar, 2005)
<i>Weissella koreensis</i>	Potenziamento dell'immunità (Wang, Yoo, <i>et al.</i> , 2011)	PPO	Catalizzatore per l'ossidazione e la degradazione dei fenoli (Tomás-Barberán & Espín, 2001)
SOD	Enzima antiossidante	LOX	Generazione di sapori sgradevoli e perdita di nutrienti (Gökmen <i>et al.</i> , 2005)
		Allina liasi	Allergenicity (Kao <i>et al.</i> , 2004)

Abbreviazioni: SOD, superossido dismutasi; POD, perossidasi; PPO, polifenolo ossidasi; LOX, lipossigenasi.

In confronto, il glucosio viene probabilmente assorbito attraverso il tratto gastrointestinale, entra nel flusso sanguigno e viene trasportato alle cellule del corpo e poi viene trasportato alle cellule dell'organismo. Il metabolismo del glucosio attraverso la via glicolitica è controllato dall'esochinasi IV o dalla glucochinasi; di conseguenza, il glucosio viene convertito in fruttosio 1,6-difosforilato prima della scissione in un metabolismo a tre carboni, il diidrossiacetone fosfato e la gliceraldeide 3-fosfato (Steinmann e Santer, 2012; Tappy e Lê, 2010). Vale la pena notare che, sebbene il

fruttosio e il glucosio contribuiscano al mantenimento del normale livello di zucchero nel sangue, un'elevata assunzione di fruttosio influisce negativamente sulla salute umana, causando problemi di salute come sovrappeso, obesità, insulino-resistenza, diabete, dislipidemia, malattia aterosclerotica e malattia del fegato grasso. I FOS presenti nell'aglio si comportano probabilmente come altri prebiotici presenti in alimenti non a base di aglio, che sono resistenti alla digestione nello stomaco e nell'intestino tenue (Ellegård *et al.*, 1997), ma vengono metabolizzati nel colon per produrre SCFA e stimolano selettivamente la crescita e l'attività di alcuni batteri del colon, come *Bifidobacteria*, *Lactobacillus* e *Bacteroides* (Bouhnik *et al.*, 1999). Questi SCFA e quelli derivati direttamente dalle specie lipidiche presenti nell'aglio potrebbero lavorare insieme per fornire benefici alla salute, come l'inibizione della crescita di microrganismi patogeni e la regolazione della composizione della flora intestinale, del volume cellulare, del trasporto di ioni, della proliferazione, della differenziazione e dell'espressione genica (Wong *et al.*, 2006). Pertanto, sono necessarie ulteriori ricerche per mantenere il più possibile il contenuto di FOS nell'aglio nero e non influenzare il processo di annerimento.

Composti bioattivi con proprietà funzionali (come ad es. attività antiossidanti, antimicrobiche e antiipertensive), che possono essere potenziate nell'aglio nero, meritano attenzione. La biotrasformazione di tutte le diverse forme di melanoidine rimane ancora poco chiara. Le melanoidine, le premelanoidine e i loro prodotti di degradazione potrebbero essere assorbiti direttamente o trattenuti nell'organismo, oppure essere sottoposti a biotrasformazione che coinvolge una varietà di vie e reazioni attraverso la degradazione intestinale da parte di enzimi digestivi e microbici (Faist e Erbersdobler, 2001). E' bene evidenziare il duplice effetto delle melanoidine sui microrganismi: (a) attraverso l'interazione diretta con i microbi (come descritto nelle sezioni precedenti) e (b) attraverso l'influenza indiretta dei suoi metaboliti (prodotti tramite fermentazione da parte del microbiota intestinale) sulla produzione di SCFA (Borrelli *et al.*, 2004; Delgado-Andrade *et al.*, 2017). Un altro importante gruppo di antiossidanti, i polifenoli, può esercitare un'influenza significativa sull'uomo. Il destino metabolico delle diverse specie di polifenoli varia e dipende dalle loro strutture chimiche (come il modello di glicosilazione e il grado di polimerizzazione) e dalle loro matrici alimentari: alcuni possono essere utilizzati direttamente dall'organismo, mentre gli altri possono subire una biotrasformazione in altri composti o persistere nel colon, dove sono esposti alla comunità microbica intestinale (Van Dorsten *et al.*, 2010). Numerosi flavonoidi alimentari esercitano benefici significativi per la salute dell'uomo dopo processi metabolici che coinvolgono la scomposizione, la modifica, la trasformazione e l'assorbimento all'interno del corpo umano (Hollman e Katan, 1997). Le interazioni tra polifenoli e microbiota sono molto complesse, con alcuni polifenoli in grado di modulare le interazioni tra altri polifenoli e microrganismi (Selma *et al.*, 2009). Alcuni composti fenolici come le catechine, le

epicatechine e i loro derivati sono stati trovati in grado di interagire con alcune specie microbiche ed esercitare effetti benefici (ad es, aumento dell'abbondanza di *Bifidobacterium*) (Jin, *et al.*, 2012). L'aumento significativo dei fenoli totali e dei flavonoidi (soprattutto epicatechine) dopo la trasformazione di aglio fresco in aglio nero (Martínez-Casas, 2017) indica che il consumo di aglio nero potenzialmente porta benefici per la salute associati ai composti fenolici.

Il 5-HMF viene generato in grandi quantità durante la produzione dell'aglio nero; pertanto, è necessario prestare attenzione al suo destino e alle potenziali influenze sull'uomo dopo la sua ingestione. Il 5-HMF può essere metabolizzato principalmente attraverso vie che prevedono l'ossidazione in acido 5-idrossimetil-2-furoico seguita dalla coniugazione con la glicina in 5-idrossimetil-2-furoico o la conversione in solfossimetilfurfurale tramite solfonazione catalizzata da sulfotransferasi (Ferreira *et al.*, 2019). IL 5-HMF può esistere in forme metilate, acetilate e glucuronidate a causa dell'azione di diversi batteri intestinali umani (Zhao *et al.*, 2014). Alla fine, il 5-HMF può essere escreto nelle forme di N-(5-idrossimetil-2-furoil) glicina (attraverso le urine), acido 2,5-furandicarbossilico, 5-sulfoximetilfurfurale, e CO₂ (Capuano e Fogliano, 2011), oppure rimangono nei reni, vescica e fegato. Recenti esperimenti hanno dimostrato che il 5-HMF potrebbe essere attivato in nucleofili altamente reattivi che potrebbero reagire con il DNA. Non esistono studi epidemiologici o casi di studio sull'associazione tra l'assunzione di 5-HMF e il rischio di cancro nell'uomo, sebbene gli esperimenti sugli animali indichino la tossicità del 5-HMF (Ferreira *et al.*, 2019). Dato il contenuto relativamente elevato di zuccheri riducenti e oligosaccaridi, polifenoli e prodotti della reazione di Maillard (come il 5-HMF e le melanoidine) nell'aglio nero, non è consigliabile friggere o cuocere a lungo ad alte temperature. È preferibile il consumo diretto dell'aglio nero o il suo utilizzo come condimento per una cottura molto breve, soprattutto in considerazione del fatto che il contenuto di 5-HMF nell'aglio nero è relativamente alto.

6. CONCLUSIONI DELLO STATO DELL'ARTE.

Il lavoro raccolto in questa tesi fornisce le conoscenze più aggiornate sulle modifiche dei principali componenti durante il processo di trasformazione dell'aglio fresco in aglio nero, come umidità, lipidi, carboidrati (compresi gli zuccheri), aminoacidi, acidi organici, OSC, polifenoli, alcaloidi, 5-HMF, melanoidine, vitamine, minerali, enzimi (tra cui la SOD) ed endofiti dell'aglio. Le conoscenze ottenute confermano che l'aglio nero presenta diversi vantaggi rispetto all'aglio fresco per quanto riguarda le caratteristiche sensoriali e di manipolazione del prodotto, oltre che per le potenziali proprietà biologiche (in particolare le attività antiossidanti). L'aglio nero ha un elevato valore nutrizionale, esercita effetti protettivi sul sistema nervoso e presenta effetti antitumorali, antiobesità, antinfiammatori, immunostimolanti, antiallergici, epatoprotettivi, cardioprotettivi, di riduzione dello

stress ossidativo ed effetti di riduzione della sindrome da sbornia. Pertanto, l'aglio nero potrebbe essere commercializzato come nuovo snack salutare o alimento funzionale dopo aver colmato le lacune di conoscenza identificate. Oltre al tipo e alle caratteristiche dei materiali di partenza (aglio fresco), una serie di fattori può influenzare direttamente le qualità sensoriali e nutrizionali dell'aglio nero, tra cui il tipo di tecnologie di lavorazione, le variabili di lavorazione (temperatura, umidità, tempo, pH della matrice, solvente e presenza di ossigeno), presenza e tipo di pretrattamento. Alcuni processi e reazioni sono particolarmente cruciali per le caratteristiche dell'aglio nero finale, tra cui la reazione di Maillard, la degradazione di sostanze macromolecolari e la fermentazione microbica con endofiti (e in parte con microrganismi ambientali in una certa misura). Le interazioni tra i componenti dell'aglio e i microrganismi endofiti, nonché l'interazione tra il pretrattamento e il processo di produzione principale, determinano il profilo dell'aglio nero finale. Questo elaborato indica anche le lacune delle conoscenze in relazione alla creazione di processi efficienti per la produzione industriale di aglio nero, che permettano il monitoraggio quantitativo dei cambiamenti dei metaboliti target e delle qualità nutrizionali e sensoriali dell'aglio nero. Per selezionare le proprietà sensoriali, nutrizionali e salutari dell'aglio nero è fondamentale comprendere come avviare e promuovere la formazione di sostanze desiderate attraverso la trasformazione, inibendo o addirittura eliminando quelle indesiderate. Sono necessarie ulteriori ricerche ed i seguenti aspetti sono probabilmente dei punti di partenza per comprendere la formazione e il potenziamento dei componenti caratteristici dell'aglio nero: (a) è necessario condurre indagini approfondite sul tipo e sulla precisa modalità d'azione degli endofiti dell'aglio e l'impatto della loro presenza e delle loro prestazioni sulla produzione di aglio nero e sul profilo dei composti aromatici caratteristici, sostanze nutritive e bioattive nell'aglio nero; (b) è necessaria un'ulteriore delucidazione dei meccanismi di formazione e del ruolo dei principali composti sensoriali e delle sostanze bioattive nell'aglio nero; c) è necessario condurre studi sulla relazione tra le caratteristiche organolettiche e i cambiamenti microstrutturali durante la produzione di aglio nero (soprattutto in ambito industriale) per favorire l'ottimizzazione della stabilità del prodotto e dell'attrattiva sensoriale; d) è necessario condurre esami sulla sicurezza dell'aglio nero, compresa la sicurezza di alcuni composti particolari presenti nell'aglio nero (come il 5-HMF); e) è necessario condurre studi per regolare i parametri per la conservazione del prodotto in sicurezza.

7. ALTRI PRODOTTI INVECCHIATI TERMICAMENTE

7.1 CIPOLLA NERA

Il genere *Allium* comprende la comune cipolla (*Allium cepa* L.), il cui consumo è stato a lungo collegato a risultati benefici per la salute (Wan *et al.*, 2019). Il consumo di cipolla è stato collegato a effetti protettivi contro i disturbi cardiaci e renali, nonché a effetti preventivi contro il diabete mellito di tipo 2 e l'ipertensione arteriosa (Bahadoran *et al.*, 2021; Galeone *et al.*, 2009). La ragione principale di questi benefici per la salute è la presenza di sostanze bioattive, in particolare composti organici dello zolfo (OSC) e (poli)fenoli (Zhao *et al.*, 2021; Shang *et al.*, 2019). Il principale ingrediente fenolico delle cipolle è la quercetina, la cui ingestione è stata collegata a benefici cardioprotettivi. Invece, fra gli OSC, il cui consumo regolare di isoalliina è legato a una riduzione del rischio di malattie cardiovascolari (Patel *et al.*, 2018) e di alcuni tipi di cancro attraverso una serie di meccanismi, come il rafforzamento dell'immunità, l'innescamento dell'apoptosi, l'eliminazione degli agenti cancerogeni o la reazione con le specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Miękus *et al.*, 2020; Vazquez-Prieto e Miatello, 2010). L'aglio e la cipolla contengono composti organosolforati che hanno dimostrato di avere proprietà antiossidanti, antinfiammatorie, antibatteriche, antipertensive e di altro tipo (Walag *et al.*, 2020). L'industria alimentare ha recentemente creato un prodotto chiamato cipolla nera che si ottiene da cipolle fresche e viene invecchiato senza l'uso di additivi o microrganismi in condizioni di temperatura e umidità regolate (Won, 2008). È stato dimostrato che il processo di invecchiamento cambia le qualità sensoriali e la composizione fitochimica del prodotto iniziale. Infatti, le cipolle nere hanno un colore marrone più scuro, una consistenza più morbida e un sapore più dolce e meno piccante rispetto al prodotto originale. La composizione è cambiata, principalmente con un aumento importante di isoalliina, fruttosio, glucosio e acido tartarico e una diminuzione dei composti fenolici (Moreno-Ortega *et al.*, 2020). Studi precedenti hanno dimostrato un contenuto totale di composti fenolici nella cipolla nera compreso tra 19,7 e 41,1 mg per 100 g DW, a seconda della varietà, con la quercetina come principale composto (19,5-40,8 mg per 100 g DW). Mentre i composti organosolforati hanno mostrato una concentrazione compresa tra 841 e 1650 mg per 100 g DW, con l'isoalliina come principale con una concentrazione tra 703 e 1360 mg per 100 g DW. Eliminando le caratteristiche sfavorevoli delle cipolle fresche a livello sensoriale e di digeribilità, le cipolle nere hanno maggiori probabilità di essere acquistate dai consumatori in quanto più accettate. Nonostante le aspettative date dalla composizione di questo nuovo prodotto, finora non sono state condotte ricerche che abbiano collegato il consumo di cipolle nere a benefici per la salute. È stato scoperto che l'isoalliina, il principale OSC presente sia nelle cipolle fresche che in quelle nere, così come altri OSC, hanno proprietà benefiche per la salute (Goncharov *et al.*, 2016). I polifenoli e gli OSC delle cipolle devono essere bioaccessibili, liberati dalla matrice alimentare e predisposti all'assorbimento per avere effetti positivi in vivo (Rein *et al.*, 2013; Pellegrini *et al.*, 2017). Moreno-Ortega e colleghi (2021) hanno valutato in precedenza la bioaccessibilità di (poli)fenoli e OSC in cipolle fresche e

nera (Moreno-Ortega *et al.*, 2016). La ricerca ha dimostrato che gli OSC e i polifenoli della cipolla nera sono più bioaccessibili rispetto alla cipolla fresca.

7.2 SCALOGNO NERO (*ALLIUM ASCALONICUM*).

Lo scalogno è una delle *Liliaceae* più popolari nella cucina asiatica ed è una buona fonte di fibre, proteine e vitamine A, B e C. Inoltre, contiene un'ampia gamma di sostanze flavonoidi e fenoliche, tra cui rutina, kaempferolo, acido gallico, apigenina, eriodictyol, quercetina, iso-quercerina e catechina. I vantaggi dello scalogno per la salute, tra cui le sue proprietà anticancro, antivirali, antibatteriche, antiobesità, antimicrobiche, antinfiammatorie, antiossidanti, epatoprotettive e nefroprotettive, possono essere spiegati dall'esistenza di varie sostanze bioattive in esso contenute (Moldovan *et al.*, 2022). Insieme alle cipolle, lo scalogno è uno dei prodotti più commercializzati al mondo, con un valore complessivo di 3,87 miliardi di dollari nel 2020 (OEC., 2020). Lo scalogno è una delle colture più importanti del Vietnam. Viene coltivato in alcune regioni specializzate, come Quang Ngai (isola di Ly Son), Soc Trang (città di Vinh Chau) e Ninh Thuan (città di Ninh Hai), e genera circa 3,26 milioni di dollari di entrate locali insieme alle cipolle (OEC., 2020). Di recente, si è assistito a una diminuzione dei ritorni economici per gli agricoltori, nonché a un declino delle competenze e della sostenibilità della coltivazione locale dello scalogno, a causa della sovrapproduzione di prodotti locali e della concorrenza dello scalogno a basso costo importato da altri Paesi.

Lo scalogno fresco è limitato nella conservazione e nell'uso a lungo termine a causa dell'elevato contenuto di umidità, del sapore piuttosto pungente e della consistenza delicata. Alcuni prodotti di trasformazione, come lo scalogno essiccato, lo scalogno in polvere, lo scalogno in salamoia e la marmellata di scalogno, sono stati storicamente sviluppati per il mercato asiatico. Recentemente sono stati sviluppati altri prodotti, come il succo, la polvere e l'estratto di scalogno essiccato in tamburo (Wongmekiat *et al.*, 2008 ; Setyadjit e Sukasih, 2015). L'estratto di scalogno ha un effetto nefroprotettivo e potrebbe essere utilizzato come trattamento adiuvante per il trattamento con ciclosporina (Wongmekiat *et al.*, 2008). Inoltre, Setyadjit e Sukasih hanno utilizzato un essiccatore a tamburo per creare una polvere di scalogno potenziata con antiossidanti e fibre aggiungendo il 5% di maltodestrina e il 10% di amido di manioca (Setyadjit e Sukasih, 2015). Il metodo più promettente e creativo è l'uso dell'invecchiamento e della lavorazione a caldo per trasformare il sapore sgradevole e acuto dello scalogno fresco in un prodotto marrone scuro, dalla consistenza gommosa e dal sapore dolce, chiamato scalogno nero.

Lo scalogno nero è un prodotto trasformato ottenuto dalla stagionatura dello scalogno in un ambiente con umidità relativa controllata e temperature elevate. Il processo di invecchiamento dello scalogno innesca una serie di eventi chimici complessi, come le reazioni di imbrunimento

enzimatico (come l'ossidazione dei fenoli) e non enzimatico (come la reazione di Maillard e la caramellizzazione), come per altri prodotti simili (Kang, 2016; Tran, 2019). Inoltre, il trattamento termico innesca e velocizza la reazione di Maillard, un processo di imbrunimento non enzimatico avviato dalla condensazione degli zuccheri riducenti con i gruppi aminoacidici. Si producono melanoidine, composti di colore marrone scuro e ad alto peso molecolare, che trasformano lo scalogno fresco in scalogno nero, un prodotto di colore marrone scuro (Nascimento, 2021).

Il processo di invecchiamento dello scalogno nero ha migliorato le qualità sensoriali del prodotto (come la dolcezza e l'assenza di sapore piccante) e alcuni dei suoi benefici per la salute (come le proprietà antinfiammatorie, antitumorali e antiossidanti). Rispetto allo scalogno fresco, alcuni componenti benefici trovati nello scalogno nero, come la quercetina, gli aminoacidi a catena ramificata, l'isoleucina, la leucina, la valina e i composti organosolforati come l'isoalliina, sono più elevati (Moreno-Rojas, 2019). L'estratto di scalogno nero ottenuto con ultrasuoni è uno dei prodotti culinari innovativi che i ricercatori hanno recentemente ottenuto dallo scalogno nero (Tran, 2022). Nonostante la crescente domanda di scalogno nero e la quantità di studi sulle sue applicazioni, la produzione di scalogno nero è attualmente limitata a progetti pilota, poiché i lotti differiscono in termini di qualità.

7.3 AGRUMI NERI

I limoni neri secchi sono la forma lavorata dei frutti di scarto dell'agricoltura dei limoni. È interessante notare che durante la stagione della raccolta con produzione alta, questi usi sono bassi; in quel periodo, i limoni freschi vengono trasformati in limoni neri. Il limone nero, noto anche come "loumi" o "aswad", è una conserva di lime bollita in acqua salata e poi essiccata. Nonostante il fatto che questi frutti possiedano importanti antiossidanti con potenziali usi, hanno ricevuto un'attenzione scientifica limitata e le loro performances dipendono da una serie di variabili, tra cui la varietà, il livello di maturazione, la lavorazione e la stagione (Tinello e Lante, 2017; Kıvrak *et al.*, 2016). Il limone e i suoi componenti, così come l'estratto liquido del frutto, la pelle grassa e le parti del corpo, offrono un'ampia gamma di vantaggi terapeutici. Grazie alle loro proprietà anticancerogene e chemiopreventive, possono essere prodotti commercialmente come farmaci (Chaisawadi *et al.*, 2005). Numerosi studi hanno dimostrato il ruolo significativo degli agrumi nel funzionare come agente antibatterico per bloccare e inibire i batteri in decomposizione o i patogeni di origine alimentare, proteggendo anche l'organismo dal rischio di tumori maligni, in particolare nello stomaco e nel colon (Singh *et al.*, 2021). S

si ritiene che i limoni neri contengano un'elevata concentrazione di composti bioattivi, tra cui flavonoidi, fenoli, terpenoidi, saponine, tannini e carotenoidi. I limoni neri sono un esempio di prodotti agricoli di scarto ricchi di sostanze fitochimiche, in particolare fenoli, essenziali per la crescita, la riproduzione e la capacità di contrastare le malattie e gli effetti delle radiazioni. Le sostanze fitochimiche hanno proprietà biologiche significative (Chiorcea-Paquim *et al.*, 2020). L'organismo è sottoposto a stress ossidativo a causa di una sovrabbondanza di radicali liberi; tuttavia, questo stress può essere attenuato dagli antiossidanti presenti naturalmente in frutti come gli agrumi. Lo stress ossidativo cronico è stato collegato a numerose patologie, come le malattie cardiache, il cancro e l'invecchiamento precoce. Pertanto, gli antiossidanti naturali possono essere utilizzati per gestire la miriade di problemi di salute causati dall'ossidazione e da altri problemi metabolici (Kıvrak *et al.*, 2017). Al giorno d'oggi, i metaboliti fenolici sono attivamente studiati per la loro vasta gamma di proprietà biologiche, come la capacità di chelare i metalli, modificare le vie di trasduzione del segnale, inibire la crescita cellulare e avere un ruolo enzimatico (Del Rio *et al.*, 2013). Inoltre, l'eccesso di rifiuti agricoli scaricati nei campi contribuisce anche all'inquinamento e al degrado dell'ecosistema. Questi beni fungono da rifugio per insetti, parassiti e microrganismi che causano malattie nei campi agricoli. Quando i rifiuti si decompongono e si infiltrano nelle acque sotterranee, questi organismi rilasciano anche micotossine e altre sostanze pericolose. Il limone nero può essere aggiunto alle preparazioni culinarie per migliorarne il sapore e la consistenza del cibo.

8 FASE SPERIMENTALE: STUDIO DI FATTIBILITÀ

Nella parte sperimentale è stata realizzata una prova su scala di laboratorio per verificare la fattibilità di produrre aglio nero a partire da Aglio Rosso di Sulmona e i risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli derivanti da un processo analogo ma a partire dall'Aglio di Voghiera, ritenuto un benchmark nella scelta della materia prima.

8.1 MATERIALI E METODI

8.1.1 PRODUZIONE AGLIO NERO

Per lo studio sono stati utilizzati due varietà di aglio (*Allium sativum* L.), aglio rosso di Sulmona e aglio di Voghiera. Il processo di trasformazione ad aglio nero è stato condotto utilizzando un fermentatore multifunzione, utilizzabile anche per la produzione di altri prodotti come yogurt, aceto, natto ecc. Nel processo di produzione dell'aglio nero, sono stati selezionati bulbi di aglio in condizioni ottimali. Dopo aver rimosso la parte superiore, i bulbi sono stati inseriti all'interno di un

cestello collocato nella pentola di fermentazione (Fig. 1). Una volta sigillato il fermentatore, i parametri di processo sono stati impostati per mantenere una temperatura di 75°C per un periodo di 12 giorni. Ogni fermentatore è stato carico con 1 kg di bulbi di aglio, con l'esecuzione di 3 repliche biologiche per ciascuna varietà di aglio. Al fine di osservare il cambiamento dei vari parametri come pH, Aw, colore, umidità e texture, sono stati effettuati prelevamenti in tempi diversi durante il processo. I campioni sono stati prelevati prima del trattamento, dopo sei giorni e al termine del processo (12 giorni). Nella tabella 1 vengono riportate le informazioni dei prodotti e delle analisi effettuate.



Figura 1 Fermentatore multifunzione

Tabella 1 Analisi effettuate

Campioni	Analisi condotte	Repliche tecniche	Repliche biologiche
Aglio Voghiera	Campionamento microbico, pH, Aw, Umidità, Colore, Texture	2	3
Aglio Sulmona	Campionamento microbico, pH, Aw, Umidità, Colore, Texture	2	3

8.1.2 CAMPIONAMENTO MICROBICO

Per il prelievo, sono stati impiegati due tipi di terreni di coltura: il PCA (Plate Count Agar; Oxoid™) per la rilevazione dei batteri mesofili e psicrotrofi, e il SDA (Sabouraud Dextrose Agar; Oxoid™) per la determinazione di lieviti e muffe. L'SDA è stato arricchito con l'antibiotico cloranfenicolo (0,1 g/l) per inibire la crescita batterica. Il campione composto da 5 grammi di aglio

è stato miscelato con 50 ml di soluzione fisiologica sterile, con una proporzione di 1:10, e quindi omogenizzato. Successivamente, sono state eseguite diluizioni seriali partendo da una diluizione -1 fino ad una -5, e inoculati sui terreni di coltura, prelevando e piastrando un volume di 100 μ L di sospensione. Infine, le piastre sono state incubate a 30°C per il PCA e a 35°C per SDA, per un periodo di 24 ore.

8.1.3 PH E AW

L'analisi del pH è stata condotta utilizzando un pHmetro (Mettler Toledo), figura 2, tarato con soluzioni tampone standard di pH 4.00, 7.00 e 10.00. Sono state eseguite 3 repliche tecniche utilizzando 5 g di aglio in 5 ml di acqua distillata. L'attività dell'acqua (Aw), figura 2, è stata effettuata con lo strumento AquaLab (Decagon Devices Inc., USA). Sono stati utilizzati campioni di aglio tagliati in piccole parti per coprire uniformemente la superficie della cella di misura. Questo procedimento è cruciale per garantire l'accuratezza delle misurazioni, in quanto la presenza di spazi vuoti potrebbe influenzare i risultati.



Figura 2. Strumenti di analisi utilizzati. AquaLab e pHmetro

8.1.4 UMIDITÀ

L'umidità è stata determinata tramite gravimetria fino a peso costante. Le navicelle, contenenti i campioni, sono state pesate utilizzando una bilancia analitica (Kern & Sohn) e successivamente poste in una stufa a 105°C per 24 ore (AOAC). L'umidità è stata calcolata sottraendo il peso della navicella dal peso secco e rapportandolo, in termini percentuali, al peso fresco secondo la seguente formula:

$$\text{Sostanza secca} = (\text{Peso campione secco}/\text{peso campione}) * 100$$

$$\text{Umidità (\%)} = 100 - \text{sostanza secca}$$

8.1.5 COLORE

Il colore dell'aglio è stato misurato mediante l'utilizzo di un colorimetro Minolta® CR-400 (Fig. 3), in condizioni di illuminazione ed angolo di osservazione standardizzate. Prima della misurazione, il colorimetro è stato calibrato mediante l'impiego di una mattonella di materiale ceramico di colore bianco. Per esprimere oggettivamente il colore è stato utilizzato lo spazio di colore CIELAB che consente di definire e rappresentare univocamente il colore di un oggetto in funzione di tre coordinate: la luminosità (L*), l'indice di rosso (a*) e l'indice di giallo (b*).



Figura 3. Colorimetro Minolta® CR-400.

8.1.6 PROPRIETÀ MECCANICHE

La determinazione è stata condotta tramite lo strumento TA-Hdi® Texture Analyser (Fig. 4) sul quale è stata installata una cella di carico di 25 kg equipaggiata con una sonda da 5mm di diametro, regolata ad una velocità di discesa pari a 0,5 mm/sec. Dalla curva forza-deformazione, ottenuta dallo strumento, sono stati estrapolati i valori massimi di forza, espressa in Newton (N). Questo parametro fornisce informazioni importanti sulle caratteristiche meccaniche dell'alimento, aiutando

a comprendere come l'alimento risponde agli sforzi applicati su di esso durante la masticazione o la manipolazione.



Figura 4. TA-Hdi® Texture Analyser

8.1.6 ANALISI DI ALCUNI COMPOSTI VOLATILI CON HSPME GCMS.

La valutazione dei composti organici volatili (VOCs) è stata effettuata utilizzando un gascromatografo Agilent 7890A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) accoppiato ad uno spettrometro di massa Agilent Technologies 5975 che opera in modalità di impatto elettronico (energia di ionizzazione di 70 eV) dotato di una colonna capillare Chrompack CP-Wax 52 CB (lunghezza 50 m, ID 0.32 mm) (Chrompack, Middelburg, Paesi Bassi). Il protocollo SPME-GC-MS (Solid Phase Micro-Extraction Gas Chromatography-Mass Spectrometry) e l'identificazione di composti volatili sono stati eseguiti come indicato in precedenti rapporti, con piccole modifiche (Taneyo-Saa, et al 2014; Nissen et al., 2020).

Per condurre l'analisi, 3 g di aglio spezzettato con l'impiego di una lama, sono stati collocati in flaconcini di vetro da 10 ml e conservati a -80°C . Le fasi di pre-condizionamento, assorbimento e desorbimento dell'analisi SPME-GC e tutte le procedure di elaborazione dei dati sono state condotte secondo precedenti pubblicazioni (Taneyo-Saa et al., 2014). Prima di iniziare l'analisi è stato quindi necessario scongelare i campioni e, contestualmente, la fibra è stata esposta all'ingresso del gascromatografo per 10 minuti per il desorbimento termico a 250°C in un campione vuoto, in modo da favorire l'eliminazione di possibili composti presenti da analisi precedenti. Ai campioni

sono stati aggiunti 4 mg/L di 4-metil-2-pentanololo (10.000 ppm), utilizzato come standard interno. I campioni sono stati quindi condizionati per 10 min a 40°C prima di essere iniettati in colonna, in modo da favorire la volatilizzazione dei componenti volatili. Dopodiché è stata esposta la fibra SPME (Fibra adatta a campioni biologici, Fiber Assembly – Light Blue, rivestita con carboxen-polidimetilsiloxano, 85 µm) a ciascun campione per 40 minuti, in modo da rendere possibile l'assorbimento dei composti volatili. Questa è stata poi inserita nella porta di iniezione del gascromatografo per un desorbimento del campione di 10 minuti, ai quali è seguita una corsa cromatografica di 30 minuti. Il programma di temperatura è stato: 50°C per 1 min, successivamente programmato a 1.5°C/min fino a 65 °C, ed infine a 3.5°C/min fino a 220 °C, temperatura che è stata mantenuta per 25 minuti. Le temperature dell'iniettore, dell'interfaccia e della sorgente ionica erano rispettivamente di 250, 250 e 230°C. Le iniezioni sono state effettuate in modalità splitless e l'elio (3 mL/min) è stato utilizzato come gas vettore.

8.2 RISULTATI E DISCUSSIONE

8.2.1 EVOLUZIONE DELLA CARICA MICROBICA

La determinazione della presenza di batteri mesofili e psicrotrofi è stata condotta mediante l'utilizzo del terreno di coltura generico PCA (Plate Count Agar). Questo terreno fornisce un ambiente favorevole alla crescita di una vasta gamma di batteri. D'altra parte, per identificare la presenza di lieviti e muffe, è stato impiegato il terreno selettivo Sabouraud, addizionato con cloranfenicolo, un antibiotico che agisce inibendo la crescita batterica. Analizzando l'andamento della crescita batterica nel corso del processo, i dati del grafico 1 evidenziano un lieve aumento della concentrazione batterica (espressa in UFC/g) al tempo t6, seguito da una marcata diminuzione alla fine del processo. Invece, lieviti e muffe già al t6 non presentano nessuna crescita (Grafico 2). L'assenza di microrganismi rilevabili alla conclusione del processo potrebbe essere associata alla riduzione del pH e all'attività dell'acqua (A_w) (Grafici 3 e 4).

Inoltre, è importante considerare il possibile ruolo di composti bioattivi presenti nell'aglio nero, come il 5-HMF (5-idrossimetilfurfurale) e l'allicina. Studi precedenti (Chai *et al.*, 2013; Marchese *et al.*, 2016) hanno evidenziato il potenziale effetto antimicrobico di tali composti contro una vasta gamma di microrganismi. Pertanto, è plausibile ipotizzare che la presenza di 5-HMF e allicina abbia contribuito a limitare la crescita microbica durante il processo di fermentazione. Infine, studi recenti hanno evidenziato la presenza residua di bacilli endofiti non vitali, seppur in quantità inferiore a 10^2 UFC/g. Questa popolazione rimanente potrebbe essere rilevata mediante l'impiego di tecniche molecolari (Zhichang Qiu *et al.*, 2021).

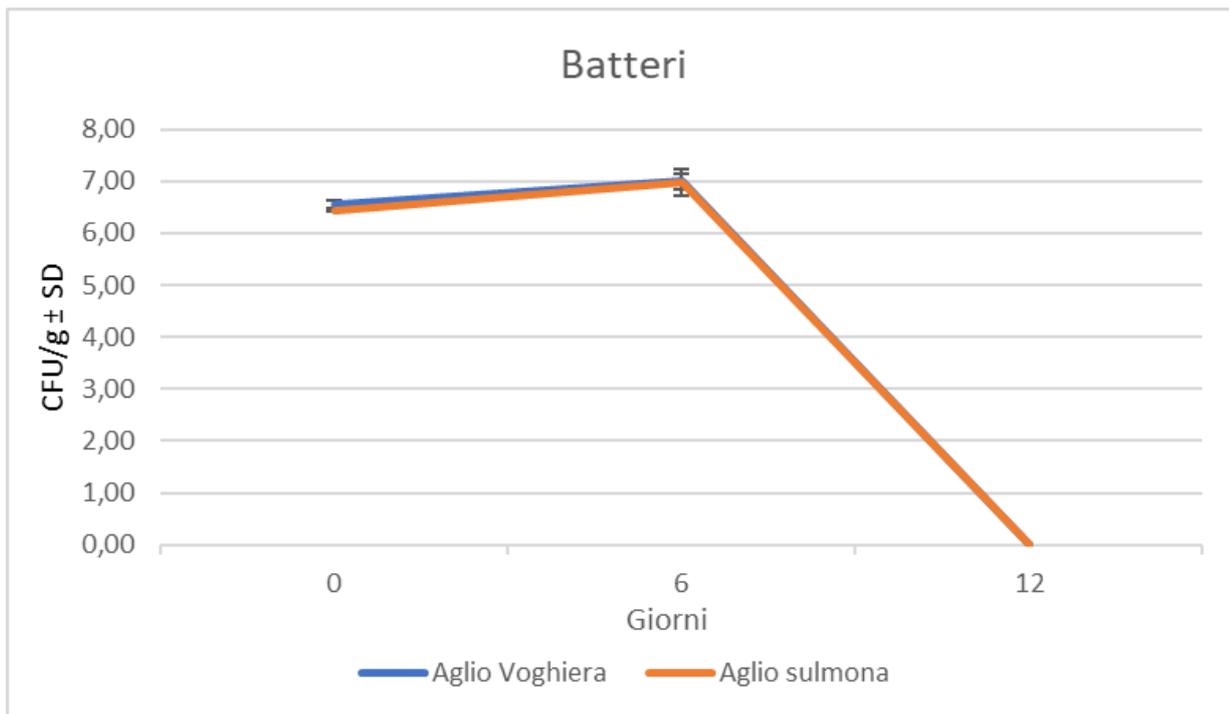


Grafico 1. Andamento crescita batterica su PCA agar

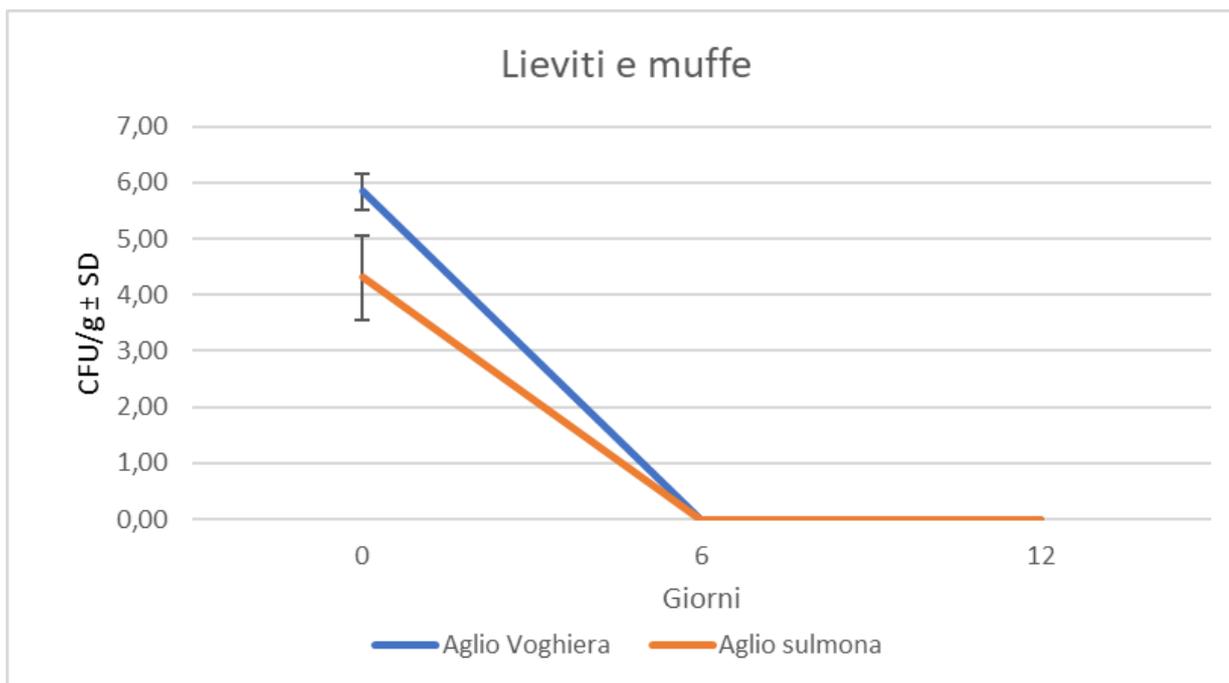


Grafico 2. Andamento crescita lieviti e muffe su SAB agar.

8.2.2 PH E AW

Il grafico 3 fornisce una panoramica dei valori di pH registrati nei diversi tempi durante il processo di produzione delle due varietà di aglio. Il declino osservato nel corso del processo è comunemente attribuito alla formazione di acidi organici, una caratteristica intrinseca del processo di trasformazione in aglio nero. È stato suggerito che la presenza di diversi acidi organici, come l'acido

acetico, l'acido formico, l'acido succinico e l'acido 3-idrossipropionico, contribuisca a questo fenomeno. Studi precedenti condotti da Liang *et al.*, (2015) hanno confermato la presenza di tali acidi organici nell'aglio nero, mentre sono assenti nell'aglio fresco, suggerendo un cambiamento significativo nella composizione chimica durante il processo di fermentazione.

In riferimento ai valori di attività dell'acqua (A_w) riportati nel grafico 4, emerge un confronto con risultati di altri studi. In effetti, diversi studi precedenti hanno riportato valori di A_w più elevati rispetto a quelli osservati in questo processo specifico. Ad esempio, Katarzyna *et al.*, (2020) hanno sottolineato la necessità di ridurre ulteriormente l' A_w per garantire la stabilità microbiologica del prodotto.

Suggeriscono che, seccando ulteriormente l'aglio dopo il processo di fermentazione, è possibile raggiungere valori di A_w inferiori a 0,85, fornendo un ambiente meno favorevole alla crescita microbica indesiderata e garantendo una maggiore sicurezza alimentare nel prodotto finale.

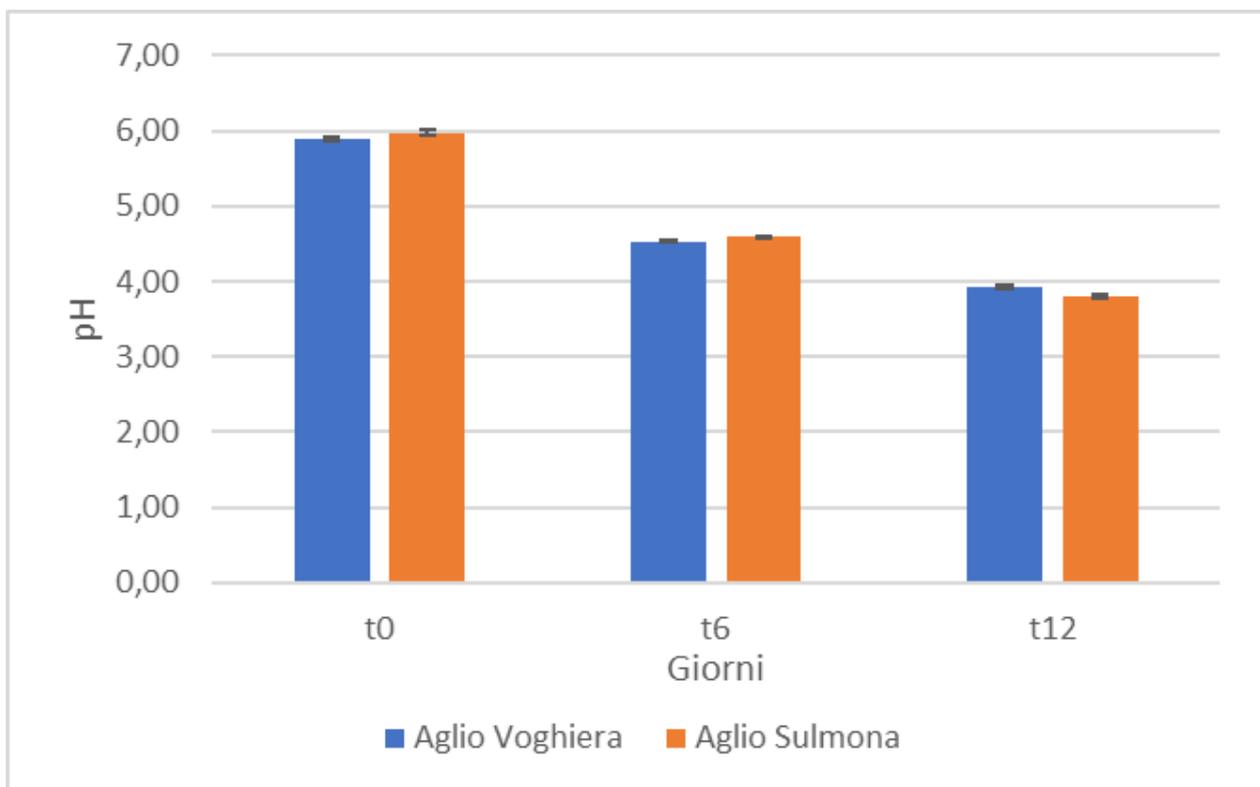


Grafico 3. Andamento pH

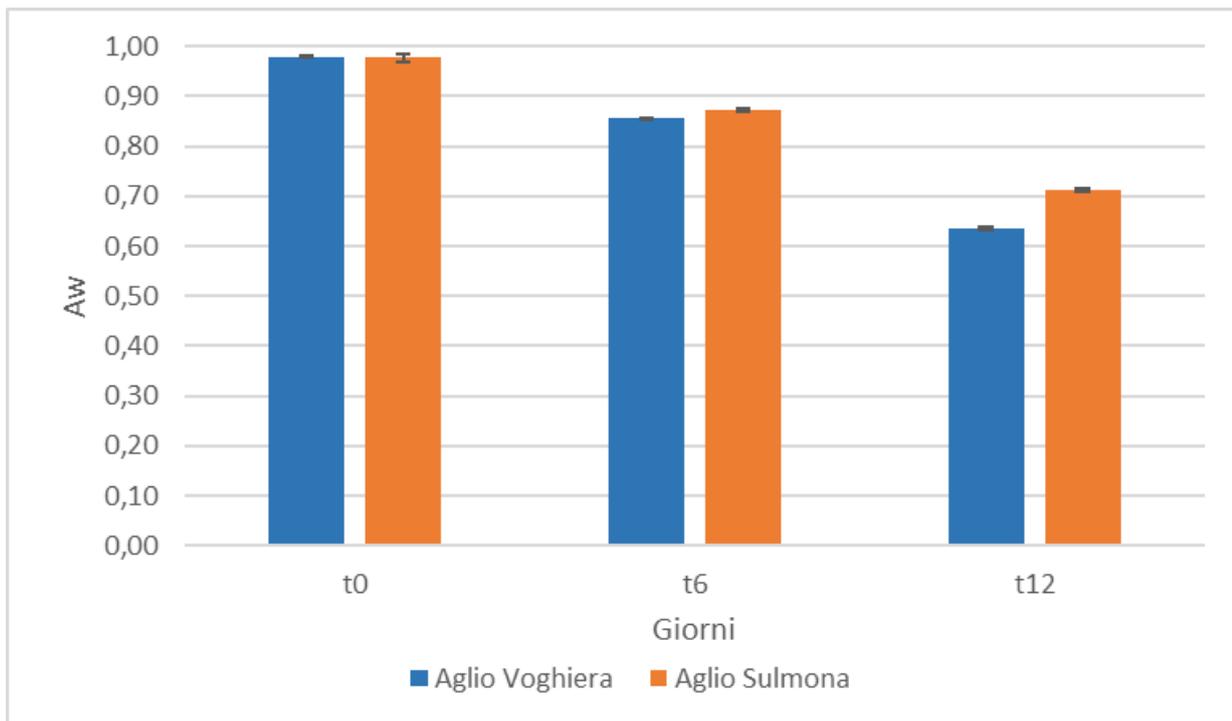


Grafico 4. Andamento Aw.

8.2.3 UMIDITA

Durante il trattamento termico, il contenuto di umidità diminuisce a causa dell'evaporazione dell'acqua. Un contenuto di umidità nell'intervallo 45%-54% favorisce lo sviluppo di una struttura texture favorevole dell'aglio nero (consistenza flessibile e gommosa) (Zhang, Li, *et al.*, 2016). L'umidità è un parametro di processo fondamentale per la produzione di aglio nero ed esercita un'influenza sulle caratteristiche sensoriali del prodotto, sul valore nutrizionale e sull'attività biologica. Fang (2017) ha dimostrato che l'umidità nella lavorazione dell'aglio ha un impatto significativo sul tasso di evaporazione, sul contenuto di umidità trattenuto, nonché sull'aspetto (come il grado di imbrunimento) e sulla consistenza dell'aglio nero. Nel presente studio si è arrivati a fine processo a livelli di umidità di 22,3% per l'aglio di Voghiera 28% per l'aglio di Sulmona (Grafico 5). Va sottolineato che non tutti gli studi in letteratura hanno riportato livelli di umidità simili; alcuni studi presentano tenori simili, mentre altri risultano più elevati. Inoltre, è rilevante notare che la durata del processo in questi studi è stata più lunga dei 12 giorni impiegati nel presente studio. (Karina L. Ríos-Ríos *et al.*, 2019; Eyad Aoudeh *et al.*, 2023; Peeraporn Pakakaew *et al.*, 2022)

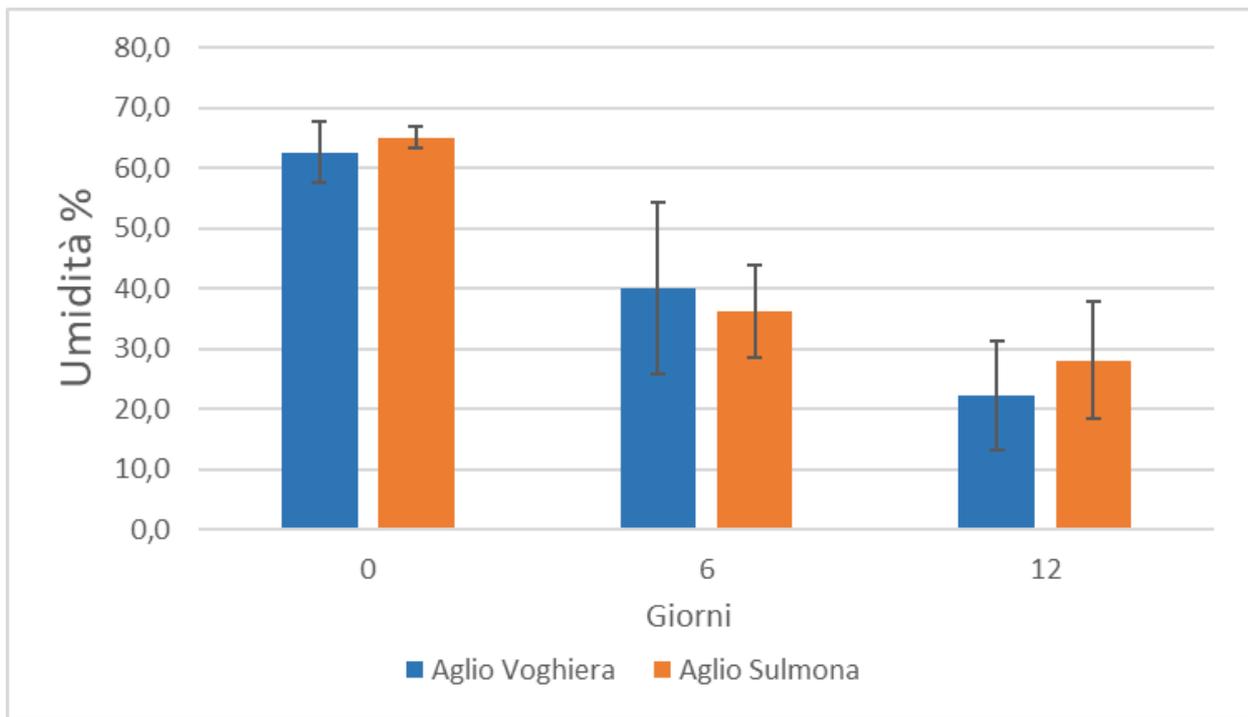


Grafico 5. Variazione umidità.

8.2.4 COLORE

La reazione di Maillard è responsabile del notevole cambiamento cromatico, passando dal colore bianco dell'aglio crudo al marrone scuro caratteristico dell'aglio nero (Kang, O. *et al.*, 2016). Questo fenomeno è il risultato della formazione di diversi composti, tra cui il 5-HMF, la melanoidina e altri composti polimerici bruni generati durante il trattamento termico (Nakagawa, K. *et al.*, 2020). L'indice di variazione del colore (ΔE) aumenta rapidamente all'aumentare della temperatura, poiché la reattività della reazione di Maillard è strettamente correlata alla temperatura del trattamento termico (Arachchi, S. J. T. *et al.*, 2017). Al fine di monitorare la dinamica del cambiamento di colore nel corso dei 12 giorni di trattamento, è stato calcolato l' ΔE come indice quantitativo, secondo la seguente formula: $\Delta E = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2}$. Tuttavia, tra i due prodotti non sono state riscontrate differenze sostanziali in termini di variazione cromatica nel periodo di osservazione (Grafico 6).

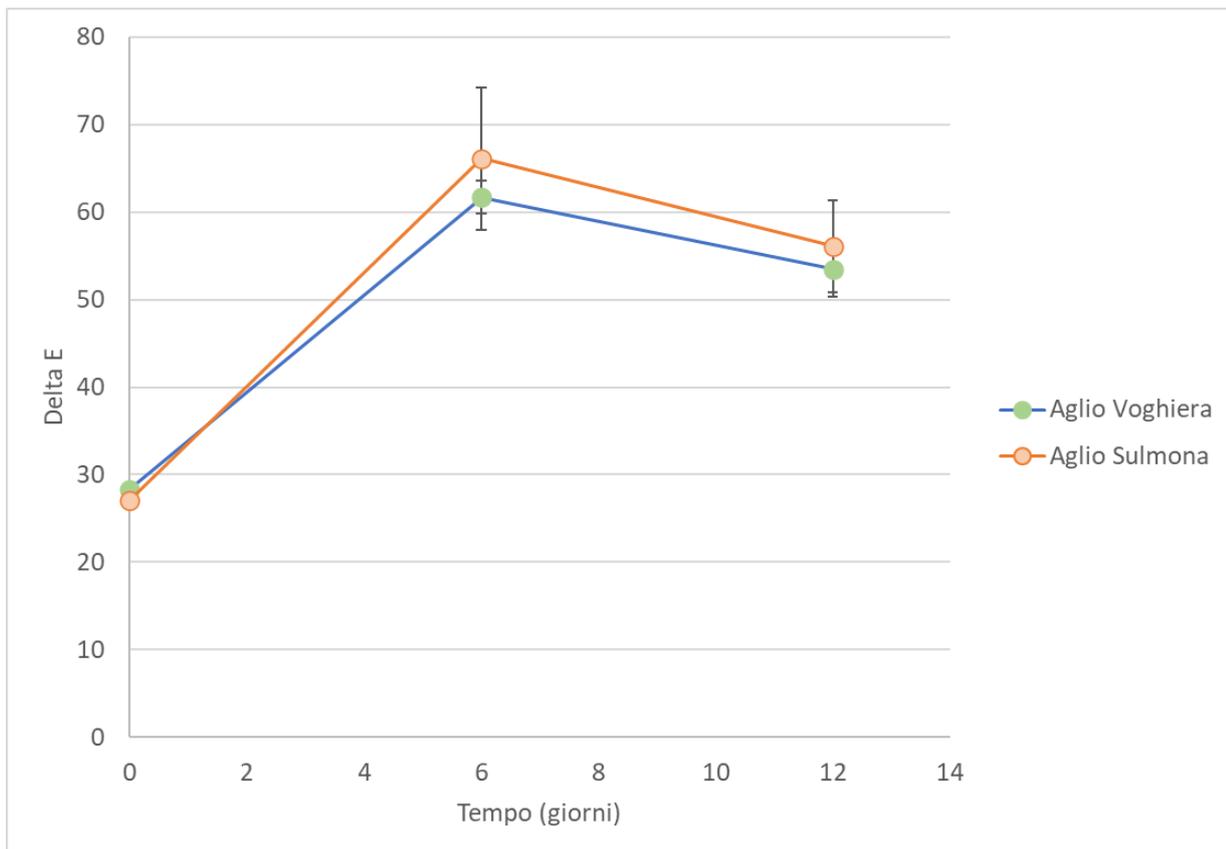


Grafico 6. Variazione del ΔE .

8.2.5 PROPRIETÀ MECCANICHE

Durante il processo la texture del prodotto cambia, diventando più gommosa, morbida e delicata. Come risultato di questi processi si crea un prodotto completamente nuovo, che guadagna in attrattiva sensoriale e ha ampie possibilità di applicazione (Najman *et al.*, 2020).

Dai risultati ottenuti (Grafico 7) emerge che nell'aglio fresco si registra una maggiore forza applicata rispetto al sesto giorno, dove si osserva una diminuzione. Tale variazione può essere attribuita al processo di maturazione dell'aglio, che comporta un aumento della sua morbidezza durante le prime fasi, seguito da un progressivo sviluppo di consistenza gommosa verso la conclusione del ciclo. Infatti, al dodicesimo giorno si osserva un aumento della forza applicata. Tuttavia, tra le due tipologie di aglio non emergono differenze.

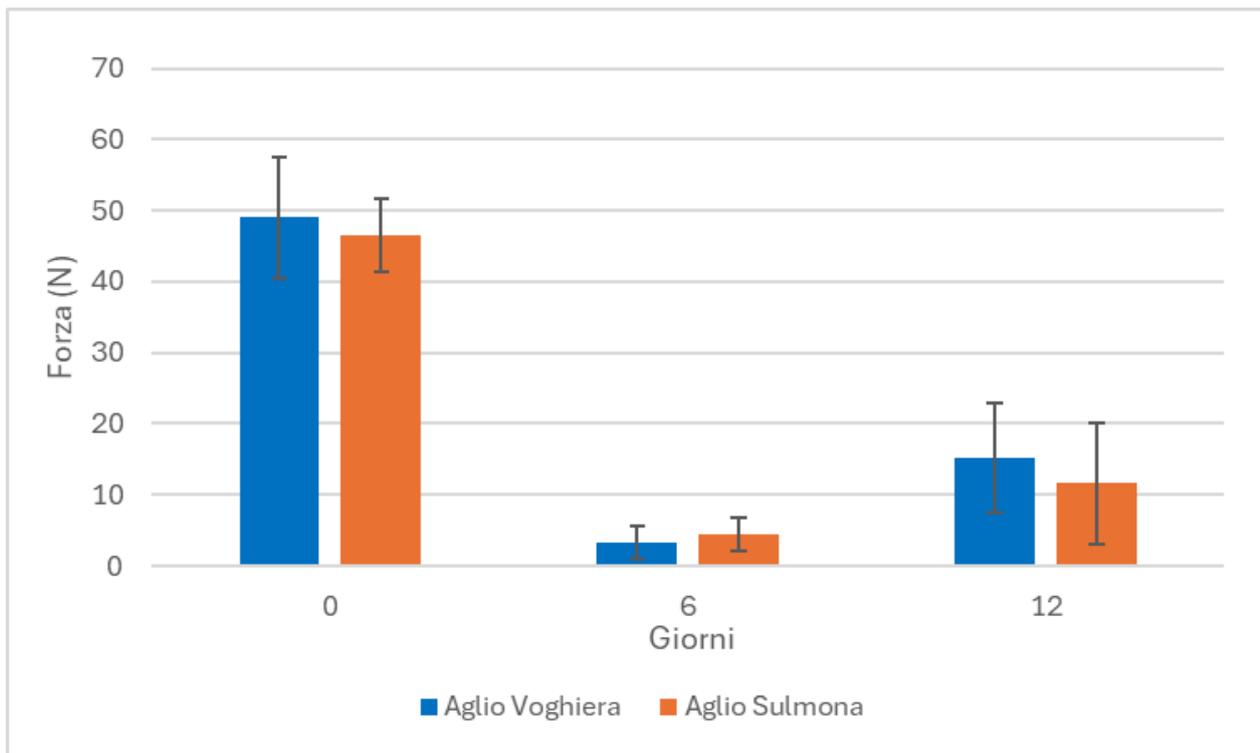


Grafico 7. Texture del prodotto.

8.2.6 ALCUNI COMPOSTI VOLATILI

L'analisi dei composti aromatici derivanti dalla reazione di Maillard ha mostrato un incremento di questi composti durante l'andamento del processo, che no erano presenti al tempo iniziale nell'aglio fresco. L'aglio Rosso di Sulmona ha mostrato avere contenuto in 5-HMF inferiore all'aglio di controllo. Invece, l'analisi dei composti solforati ha mostrato una riduzione durante il processo per DAS e DADS e un aumento per il composto DATS, con maggiore quantità nell'aglio nero derivante dall'aglio rosso di Sulmona

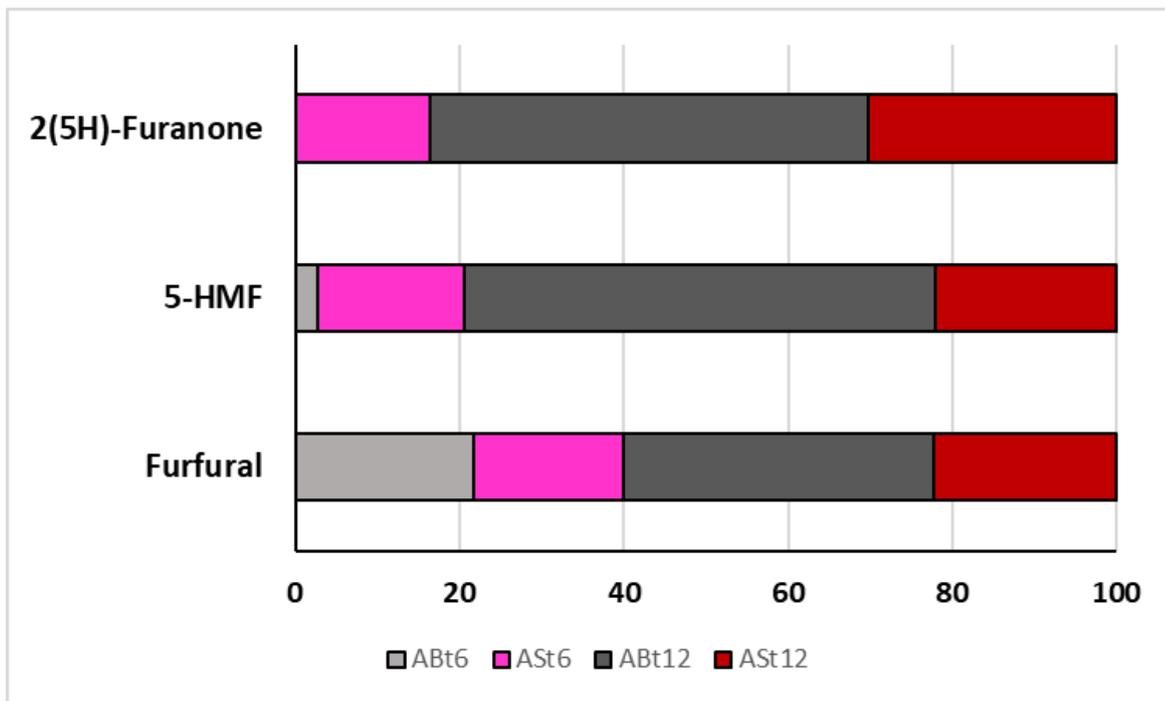


Grafico 8. Produzione di composti derivanti dalla reazione di Maillard.

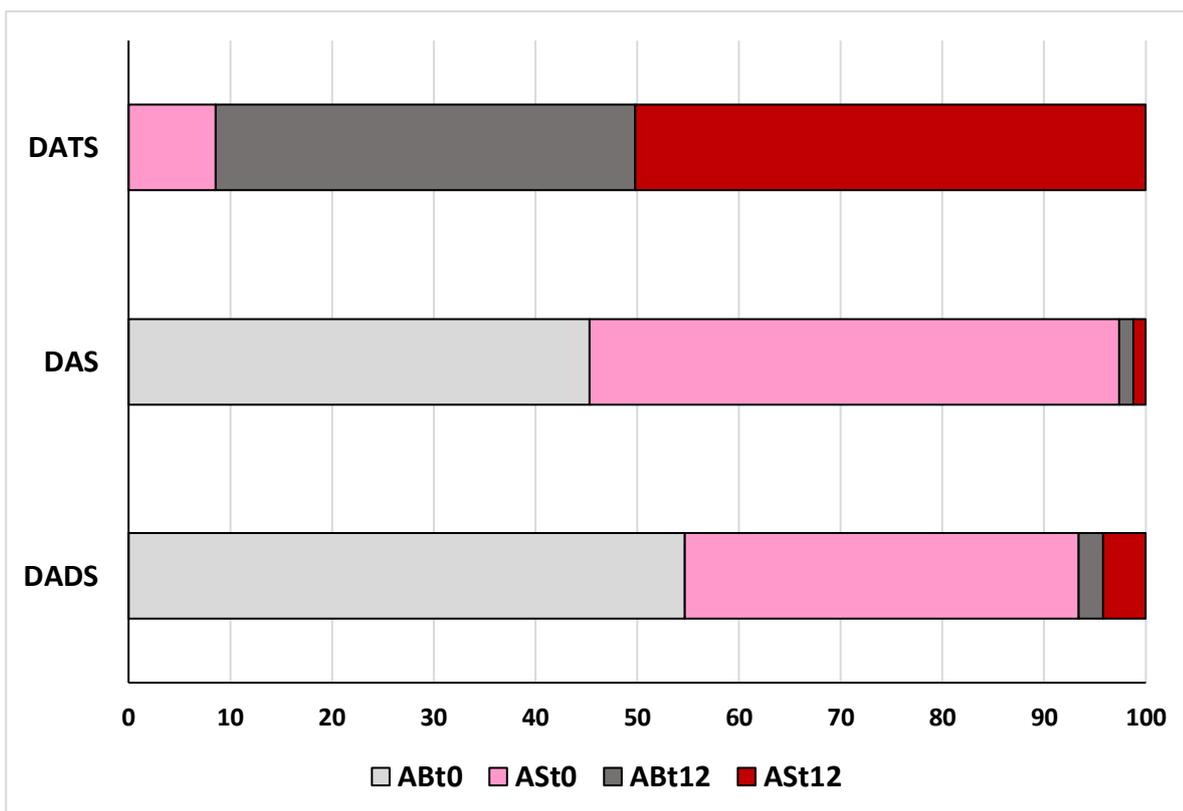


Grafico 9. Produzione di composti solforati dal catabolismo dell'allicina

9. CONCLUSIONE PARTE SPERIMENTALE

Con questo lavoro di fattibilità sono stati raccolti risultati e comparati con quelli della letteratura ed è stato possibile osservare che anche con un metodo di cottura casalingo come le vaporiere per la

cottura del riso si può produrre aglio nero. Inoltre, è stato osservato che l'aglio nero prodotto, sia a partire da quello di controllo sia a partire dall'aglio rosso di Sulmona, aveva parametri qualitativi simili ai lavori raccolti dalla letteratura ed effettuati con stufe industriali o professionali. Inoltre, con il processo esaminato il prodotto finale è stato ottenuto in soli 12 giorni, rispetto a un periodo medio riportato in letteratura di 45.

10 BIBLIOGRAFIA

AOAC. *International Official Methods of Analysis*, 18th ed.; Association of Official Analytical Chemists: Washington, DC, USA, 2000.

Chai, W. M., Liu, X., Hu, Y. H., Feng, H. L., Jia, Y. L., Guo, Y. J., *et al.* (2013). Antityrosinase and antimicrobial activities of furfuryl alcohol, furfural and furoic acid. *International Journal of Biological Macromolecules*, 57, 151–155. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.02.019>

Marchese, A., Barbieri, R., Sanches-Silva, A., Daglia, M., Nabavi, S. F., Jafari, N. J., *et al.* (2016). Antifungal and antibacterial activities of allicin: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 52, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.03.010>

Zhichang Qiu, Zhenjia Zheng, Bin Zhang, Xiaoming Lu, Xuguang Qiao, Characterization of the growth properties of garlic endophytes and their roles in the formation of black garlic, LWT, Volume 147, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111537>

Liang, T. F., Wei, F. F., Lu, Y., Kodani, Y., Nakada, M., Miyakawa, T., & Tanokura, M. (2015). Comprehensive NMR analysis of compositional changes of black garlic during thermal processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 683–691.

Najman K, Sadowska A, Hallmann E. Influence of Thermal Processing on the Bioactive, Antioxidant, and Physicochemical Properties of Conventional and Organic Agriculture Black Garlic (*Allium sativum* L.). *Applied Sciences*. 2020; 10(23):8638. <https://doi.org/10.3390/app10238638>

Zhang, X., Li, N., Lu, X., Liu, P., & Qiao, X. (2016). Effects of temperature on the quality of black garlic. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 2366–2372. K.L. Ríos-Ríos, *et al.* *Trends in Food Science & Technology* 88 (2019) 459–467

Karina L. Ríos-Ríos, Antonia Montilla, Agustín Olano, Mar Villamiel, Physicochemical changes and sensorial properties during black garlic elaboration: A review, *Trends in Food Science & Technology*, Volume 88, 2019.

Aoudeh, E., Oz, E., Kelebek, H., Brennan, C., Ahmad, N., Elobeid, T. and Oz, F. (2023), Black garlic production: The influence of ageing temperature and duration on some physicochemical and antioxidant properties, and sugar content. *Int J Food Sci Technol*, 58: 3580-3590. <https://doi.org/10.1111/ijfs.16456>

Pakakaew, P., Phimolsiripol, Y., Taesuwan, S. *et al.* The shortest innovative process for enhancing the S-allylcysteine content and antioxidant activity of black and golden garlic. *Sci Rep* 12, 11493 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15635-3>

Kang, O.-J. Physicochemical characteristics of black garlic after different thermal processing steps. *Prev. Nutr. Food Sci.* 21, 348, 2016.

Nakagawa, K., Maeda, H., Yamaya, Y. & Tonosaki, Y. Maillard reaction intermediates and related phytochemicals in black garlic determined by EPR and HPLC analyses. *Molecules* 25, 4578 (2020).

Arachchi, S. J. T., Kim, Y.-J., Kim, D.-W., Oh, S.-C. & Lee, Y.-B. Optimization of Maillard reaction in model system of glucosamine and cysteine using response surface methodology. *Prev. Nutr. Food Sci.* 22, 37 (2017).

Petrovska BB, Cekovska S. Extracts from the history and medical properties of garlic. *Pharmacogn Rev.* 2010

Al-Nagdy, S.A., Abdel-Rahman, M.O. and Heiba, H.I. (1988), Evidence for some prostaglandins in *Allium sativum* extracts. *Phyther. Res.*, 2: 196-197.

Fatima Clement, Siddanakoppalu N. Pramod, Yeldur P. Venkatesh, Identity of the immunomodulatory proteins from garlic (*Allium sativum*) with the major garlic lectins or agglutinins, *International Immunopharmacology*, Volume 10, Issue 3, 2010, Pages 316-324.

Khalid Rahman, Garlic and aging: new insights into an old remedy, *Ageing Research Reviews*, Volume 2, Issue 1, 2003, Pages 39-56.

Li, M., Yan, Y.-X., Yu, Q.-T., Deng, Y., Wu, D.-T., Wang, Y., Ge, Y.-Z., Li, S.-P. and Zhao, J. (2017), Comparison of Immunomodulatory Effects of Fresh Garlic and Black Garlic Polysaccharides on RAW 264.7 Macrophages. *Journal of Food Science*, 82: 765-771.

Horníčková, J. and Kubec, R. and Cejpek, K. and Velíšek, J. and Ovesná, J. and Stavělková, H., 20103329663, English, Journal article, Czech Republic, 28, (4), Praha, Czech Journal of Food Sciences, (298–308), Institute of Agricultural Economics and Information for the Czech Academy of Agricultural Sciences, Profiles of S-alk(en)ylcysteine sulfoxides in various garlic genotypes.

Jeong, Y.Y.; Ryu, J.H.; Shin, J.-H.; Kang, M.J.; Kang, J.R.; Han, J.; Kang, D. Comparison of Anti-Oxidant and Anti-Inflammatory Effects between Fresh and Aged Black Garlic Extracts. *Molecules* **2016**, *21*, 430.

Jae-Myung Yoo, Dai-Eun Sok, and Mee Ree Kim Journal of Medicinal Food 2014 17:1, 92-102

Galeone, Carlotta, *et al.* "Onion and garlic use and human cancer." *The American journal of clinical nutrition* 84.5 (2006): 1027-1032.

Sahu, S., *et al.* "Effect of *Allium sativum* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*." *Journal of Applied Ichthyology* 23.1 (2007): 80-86.

Corzo-Martínez, Marta, Nieves Corzo, and Mar Villamiel. "Biological properties of onions and garlic." *Trends in food science & technology* 18.12 (2007): 609-625.

Martínez-Casas, Lucía, María Lage-Yusty, and Julia López-Hernández. "Changes in the aromatic profile, sugars, and bioactive compounds when purple garlic is transformed into black garlic." *Journal of agricultural and food chemistry* 65.49 (2017): 10804-10811.

Bae, Sang Eun, *et al.* "Changes in S-allyl cysteine contents and physicochemical properties of black garlic during heat treatment." *LWT-Food Science and Technology* 55.1 (2014): 397-402.

Zhu, Chongyang, *et al.* "Ultrafast preparation of black phosphorus quantum dots for efficient humidity sensing." *Chemistry—A European Journal* 22.22 (2016): 7357-7362.

Krokida, Magdalini K., *et al.* "Drying kinetics of some vegetables." *Journal of Food engineering* 59.4 (2003): 391-403.

Krokida, Magdalini K., and D. Marinos-Kouris. "Rehydration kinetics of dehydrated products." *Journal of food engineering* 57.1 (2003): 1-7.

Baisier, Wendy M., and Theodore P. Labuza. "Maillard browning kinetics in a liquid model system." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40.5 (1992): 707-713.

Labuza, Ted P., and M. Saltmarch. "Kinetics of browning and protein quality loss in whey powders during steady state and nonsteady state storage conditions." *Journal of Food Science* 47.1 (1982): 92-96.

Kamanna, V. S., and N. Chandrasekhara. "Fatty acid composition of garlic (*Allium sativum* Linnaeus) lipids." *Journal of the American Oil Chemists' Society* 57.6 (1980): 175.

Tsiaganis, Michael C., Katerina Laskari, and Efi Melissari. "Fatty acid composition of *Allium* species lipids." *Journal of Food Composition and Analysis* 19.6-7 (2006): 620-627.

Zamora, Rosario, and Francisco J. Hidalgo. "Coordinate contribution of lipid oxidation and Maillard reaction to the nonenzymatic food browning." *Critical reviews in food science and nutrition* 45.1 (2005): 49-59.

Hidalgo, Francisco J., Fátima Nogales, and Rosario Zamora. "Changes produced in the antioxidative activity of phospholipids as a consequence of their oxidation." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53.3 (2005): 659-662.

Koch, Heinrich P., and Larry D. Lawson. "Garlic: the science and therapeutic application of *Allium sativum* L. and related species." (*No Title*) (1996).

Haytowitz, David B., and Pamela R. Pehrsson. "USDA's National Food and Nutrient Analysis Program (NFNAP) produces high-quality data for USDA food composition databases: Two decades of collaboration." *Food chemistry* 238 (2018): 134-138.

Lo Presti, Libera, *et al.* "Fungal effectors and plant susceptibility." *Annual review of plant biology* 66 (2015): 513-545.

Emsley, A. M., and R. J. Heywood. "Computer modelling of the degradation of linear polymers." *Polymer Degradation and Stability* 49.1 (1995): 145-149.

Blecker, Christophe, *et al.* "Kinetic study of the acid hydrolysis of various oligofructose samples." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50.6 (2002): 1602-1607.

Flickinger, Elizabeth A., Jan Van Loo, and George C. Fahey. "Nutritional responses to the presence of inulin and oligofructose in the diets of domesticated animals: a review." (2003): 19-60.

Nattorp, Anders, *et al.* "Model for random hydrolysis and end degradation of linear polysaccharides: Application to the thermal treatment of mannan in solution." *Industrial & engineering chemistry research* 38.8 (1999): 2919-2926.

Koch, Heinrich P., and Larry D. Lawson. "Garlic: the science and therapeutic application of *Allium sativum* L. and related species." (*No Title*) (1996).

Lee, Jungmin, and James M. Harnly. "Free amino acid and cysteine sulfoxide composition of 11 garlic (*Allium sativum* L.) cultivars by gas chromatography with flame ionization and mass selective detection." *Journal of agricultural and food chemistry* 53.23 (2005): 9100-9104.

Li, Ningyang, *et al.* "Effect of freezing pretreatment on the processing time and quality of black garlic." *Journal of Food Process Engineering* 38.4 (2015): 329-335.

Sasaki, J. I., *et al.* "Processed black garlic (*Allium sativum*) extracts enhance anti-tumor potency against mouse tumors." *Energy (kcal/100 g)* 227 (2007): 138.

Molina-Calle, María, *et al.* "Establishing compositional differences between fresh and black garlic by a metabolomics approach based on LC-QTOF MS/MS analysis." *Journal of Food Composition and Analysis* 62 (2017): 155-163.

Rejano, L., *et al.* "Chemical characteristics and storage stability of pickled garlic prepared using different processes." *Journal of Food Science* 62.6 (1997): 1120-1123.

Xu, Wen, *et al.* "Quantifying atmospheric nitrogen deposition through a nationwide monitoring network across China." *Atmospheric Chemistry and Physics* 15.21 (2015): 12345-12360.

Ritota, M., Casciani, L., Han, B. Z., Cozzolino, S., Leita, L., Sequi, P., & Valentini, M. (2012). Traceability of Italian garlic (*Allium sativum* L.) by means of HRMAS-NMR spectroscopy and multivariate data analysis. *Food chemistry*, 135(2), 684-693.

Rahman, M. S. (2007). Allicin and other functional active components in garlic: Health benefits and bioavailability. *International Journal of Food Properties*, 10(2), 245-268.

Yaylayan, V. A., Huyghues-Despointes, A., & Feather, M. S. (1994). Chemistry of Amadori rearrangement products: analysis, synthesis, kinetics, reactions, and spectroscopic properties. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 34(4), 321-369.

Limacher, A., Kerler, J., Davidek, T., Schmalzried, F., & Blank, I. (2008). Formation of furan and methylfuran by Maillard-type reactions in model systems and food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(10), 3639-3647.

Davidek, T., Robert, F., Devaud, S., Vera, F. A., & Blank, I. (2006). Sugar fragmentation in the Maillard reaction cascade: formation of short-chain carboxylic acids by a new oxidative α -dicarbonyl cleavage pathway. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(18), 6677-6684.

Fenwick, G. R., Hanley, A. B., & Whitaker, J. R. (1985). The genus *Allium*—part 1. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 22(3), 199-271.

Fenwick, G. R., Hanley, A. B., & Whitaker, J. R. (1985). The genus *allium*. Part 2. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 22(4), 273-377.

Fenwick, G. R., Hanley, A. B., & Whitaker, J. R. (1985). The genus *Allium*—part 3. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 23(1), 1-73.

Amagase, H., Petesch, B. L., Matsuura, H., Kasuga, S., & Itakura, Y. (2001). Recent advances on the nutritional effects associated with the use of garlic as a supplement. *J. Nutr*, 131(3), 955S-962S.

- Lanzotti, V. (2006). The analysis of onion and garlic. *Journal of chromatography A*, *1112*(1-2), 3-22.
- Kim, N. Y., Park, M. H., Jang, E. Y., & Lee, J. (2011). Volatile distribution in garlic (*Allium sativum* L.) by solid phase microextraction (SPME) with different processing conditions. *Food Science and Biotechnology*, *20*, 775-782.
- Yu, T. H., Lin, L. Y., & Ho, C. T. (1994). Volatile compounds of blanched, fried blanched, and baked blanched garlic slices. *Journal of agricultural and food chemistry*, *42*(6), 1342-1347.
- Cao, R., Peng, W., Wang, Z., & Xu, A. (2007). β -Carboline alkaloids: biochemical and pharmacological functions. *Current medicinal chemistry*, *14*(4), 479-500.
- Sato, E., Kohno, M., & Niwano, Y. (2006). Increased level of tetrahydro- β -carboline derivatives in short-term fermented garlic. *Plant Foods for Human Nutrition*, *61*, 175-178.
- Sato, E., Kohno, M., Hamano, H., & Niwano, Y. (2006). Increased anti-oxidative potency of garlic by spontaneous short-term fermentation. *Plant foods for human nutrition*, *61*, 157-160.
- Whaley, W. M., & Govindachari, T. R. (2004). The Pictet-Spengler Synthesis of Tetrahydroisoquinolines and Related Compounds. *Organic reactions*, *6*, 151-190.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Goran, A., & Ijic, R. (2008). Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). *Food chemistry*, *111*(4), 925-929.
- Olsson, M. E., Gustavsson, K. E., Andersson, S., Nilsson, Å., & Duan, R. D. (2004). Inhibition of cancer cell proliferation in vitro by fruit and berry extracts and correlations with antioxidant levels. *Journal of agricultural and food chemistry*, *52*(24), 7264-7271.
- Tagliacruzchi, D., Verzelloni, E., & Conte, A. (2005). Effect of some phenolic compounds and beverages on pepsin activity during simulated gastric digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(22), 8706-8713.

Montano, A., Beato, V. M., Mansilla, F., & Orgaz, F. (2011). Effect of genetic characteristics and environmental factors on organosulfur compounds in garlic (*Allium sativum* L.) grown in Andalusia, Spain. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(4), 1301-1307.

Beato, V. M., Orgaz, F., Mansilla, F., & Montaño, A. (2011). Changes in phenolic compounds in garlic (*Allium sativum* L.) owing to the cultivar and location of growth. *Plant Foods for Human Nutrition*, 66, 218-223.

Yoo, D. Y., Kim, W., Nam, S. M., Yoo, M., Lee, S., Yoon, Y. S., ... & Choi, J. H. (2014). Neuroprotective effects of Z-ajoene, an organosulfur compound derived from oil-macerated garlic, in the gerbil hippocampal CA1 region after transient forebrain ischemia. *Food and Chemical Toxicology*, 72, 1-7.

Kim, K. W., Kim, Y. T., Kim, M., Noh, B. S., & Choi, W. S. (2014). Effect of high hydrostatic pressure (HHP) treatment on flavor, physicochemical properties and biological functionalities of garlic. *LWT-Food Science and Technology*, 55(1), 347-354.

Kim, I. D., Park, Y. S., Park, J. J., Dhungana, S. K., & Shin, D. H. (2019). Physicochemical and antioxidant properties of garlic (*A. sativum*) prepared by different heat treatment conditions. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 51(5), 452-458.

Kim, J. S., Kang, O. J., & Gweon, O. C. (2013). Comparison of phenolic acids and flavonoids in black garlic at different thermal processing steps. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 80-86.

Scalzo, R. L., Iannocari, T., Summa, C., Morelli, R., & Rapisarda, P. (2004). Effect of thermal treatments on antioxidant and antiradical activity of blood orange juice. *Food chemistry*, 85(1), 41-47.

Xu, G., Ye, X., Chen, J., & Liu, D. (2007). Effect of heat treatment on the phenolic compounds and antioxidant capacity of citrus peel extract. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 55(2), 330-335.

Martínez-Casas, L., Lage-Yusty, M., & López-Hernández, J. (2017). Changes in the aromatic profile, sugars, and bioactive compounds when purple garlic is transformed into black garlic. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(49), 10804-10811.

- Borrelli, R. C., Visconti, A., Mennella, C., Anese, M., & Fogliano, V. (2002). Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6527-6533.
- Brands, C. M., Wedzicha, B. L., & van Boekel, M. A. (2002). Quantification of melanoidin concentration in sugar– casein systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(5), 1178-1183.
- Fogliano, V., Monti, S. M., Musella, T., Randazzo, G., & Ritieni, A. (1999). Formation of coloured Maillard reaction products in a gluten-glucose model system. *Food Chemistry*, 66(3), 293-299.
- Vhangani, L. N., Van Wyk, J., Thys, X., & Silabele, S. (2016). Antioxidant and inhibitory effect of Maillard reaction products (MRPs) against enzymatic browning of Granny smith apples.
- Rapusas, R. S., & Driscoll, R. H. (1995). Kinetics of non-enzymatic browning in onion slices during isothermal heating. *Journal of Food Engineering*, 24(3), 417-429.
- Wang, H. Y., Qian, H., & Yao, W. R. (2011). Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity. *Food chemistry*, 128(3), 573-584.
- Van Boekel, M. A. J. S. (2001). Kinetic aspects of the Maillard reaction: a critical review. *Food/Nahrung*, 45(3), 150-159.
- Hofmann, T. (1998). Studies on melanoidin-type colorants generated from the Maillard reaction of protein-bound lysine and furan-2-carboxaldehyde—chemical characterisation of a red coloured domaine. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 206, 251-258.
- Tressl, R., Wondrak, G. T., Garbe, L. A., Krüger, R. P., & Rewicki, D. (1998). Pentoses and hexoses as sources of new melanoidin-like Maillard polymers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(5), 1765-1776.
- Cämmerer, B., & Kroh, L. W. (1995). Investigation of the influence of reaction conditions on the elementary composition of melanoidins. *Food Chemistry*, 53(1), 55-59.

- Mossine, V. V., Barnes, C. L., Glinsky, G. V., & Feather, M. S. (1996). Molecular and crystal structure of N-(2-deoxy-D-aldohexos-2-yl)-glycines (Heyns compounds). *Carbohydrate research*, 284(1), 11-24.
- Yaylayan, V., & Sporns, P. (1987). Novel mechanisms for the decomposition of 1-(amino acid)-1-deoxy-D-fructoses (Amadori compounds): A mass spectrometric approach. *Food chemistry*, 26(4), 283-305.
- Lansalot-Matras, C., & Moreau, C. (2003). Dehydration of fructose into 5-hydroxymethylfurfural in the presence of ionic liquids. *Catalysis Communications*, 4(10), 517-520.
- Severin, I., Dumont, C., Jondeau-Cabaton, A., Graillot, V., & Chagnon, M. C. (2010). Genotoxic activities of the food contaminant 5-hydroxymethylfurfural using different in vitro bioassays. *Toxicology letters*, 192(2), 189-194.
- Michail, K., Matzi, V., Maier, A., Herwig, R., Greilberger, J., Juan, H., ... & Wintersteiger, R. (2007). Hydroxymethylfurfural: an enemy or a friendly xenobiotic? A bioanalytical approach. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 387, 2801-2814.
- Pastoriza de la Cueva, S., Álvarez, J., Végvári, Á., Montilla-Gómez, J., Cruz-López, O., Delgado-Andrade, C., & Rufián-Henares, J. A. (2017). Relationship between HMF intake and SMF formation in vivo: An animal and human study. *Molecular nutrition & food research*, 61(3), 1600773.
- Capuano, E., & Fogliano, V. (2011). Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *LWT-food science and technology*, 44(4), 793-810.
- Wagner, B., & Beil-Seidler, S. (2006). Furfural determining agents comprises an 4-amino-phenazone derivative and a barbituric acid and/or thiobarbituric acid derivative in an acidic medium. *WO2006042600-A1: MERCK Patent GMBH (MERE)*.
- Koch, H. P., & Lawson, L. D. (1996). Garlic: the science and therapeutic application of *Allium sativum* L. and related species. (*No Title*).

- Landete, J. M. (2013). Dietary intake of natural antioxidants: vitamins and polyphenols. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(7), 706-721.
- Kim, J. S., Kang, O. J., & Gweon, O. C. (2013). Comparison of phenolic acids and flavonoids in black garlic at different thermal processing steps. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 80-86.
- Kwok, K. C., Shiu, Y. W., Yeung, C. H., & Niranjana, K. (1998). Effect of thermal processing on available lysine, thiamine and riboflavin content in soymilk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77(4), 473-478.
- Ryley, J., & Kajda, P. (1994). Vitamins in thermal processing. *Food Chemistry*, 49(2), 119-129.
- Houston, M. C., & Harper, K. J. (2008). Potassium, magnesium, and calcium: their role in both the cause and treatment of hypertension. *The Journal of Clinical Hypertension*, 10(7), 3-11.
- Rayman, M. P. (2012). Selenium and human health. *The Lancet*, 379(9822), 1256-1268.
- Bannister, J. V., Bannister, W. H., & Rotilio, G. (1987). Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *Critical Reviews in Biochemistry*, 22(2), 111-180.
- Rouissi, K., Ouerhani, S., Marrakchi, R., Slama, M. R. B., Sfaxi, M., Ayed, M., ... & El Gaaied, A. B. (2009). Combined effect of smoking and inherited polymorphisms in arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferases M1 and T1 on bladder cancer in a Tunisian population. *Cancer genetics and cytogenetics*, 190(2), 101-107.
- Lagunas, L. L. M., & Castaigne, F. (2008). Effect of temperature cycling on allinase activity in garlic. *Food chemistry*, 111(1), 56-60.
- Whitfield, J. B. (2001). Gamma glutamyl transferase. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 38(4), 263-355.
- Yoshimoto, N., Onuma, M., Mizuno, S., Sugino, Y., Nakabayashi, R., Imai, S., ... & Saito, K. (2015). Identification of a flavin-containing S-oxygenating monooxygenase involved in alliin biosynthesis in garlic. *The Plant Journal*, 83(6), 941-951.

- Atashi, S., Akbarpour, V., Mashayekhi, K., & Mousavizadeh, S. J. (2011). Garlic physiological characteristics from harvest to sprouting in response to low temperature. *Journal of Stored Products and Postharvest Research*, 2(15), 285-291.
- Ramesh Bhat, A., Isaac, V., & Pattabiraman, T. N. (1979). Protease inhibitors in serum and amniotic fluid during pregnancy. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 86(3), 222-227.
- Fante, L., & Noreña, C. P. Z. (2012). Enzyme inactivation kinetics and colour changes in Garlic (*Allium sativum* L.) blanched under different conditions. *Journal of Food Engineering*, 108(3), 436-443.
- Ryan, R. P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D. J., & Dowling, D. N. (2008). Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS microbiology letters*, 278(1), 1-9.
- Krishnan, P., Bhat, R., Kush, A., & Ravikumar, P. (2012). Isolation and functional characterization of bacterial endophytes from *Carica papaya* fruits. *Journal of applied microbiology*, 113(2), 308-317.
- Toledano-Medina, M. A., Pérez-Aparicio, J., Moreno-Rojas, R., & Merinas-Amo, T. (2016). Evolution of some physicochemical and antioxidant properties of black garlic whole bulbs and peeled cloves. *Food Chemistry*, 199, 135-139.
- Kimura, S., Tung, Y. C., Pan, M. H., Su, N. W., Lai, Y. J., & Cheng, K. C. (2017). Black garlic: A critical review of its production, bioactivity, and application. *Journal of food and drug analysis*, 25(1), 62-70.
- Rappé, M. S., & Giovannoni, S. J. (2003). The uncultured microbial majority. *Annual Reviews in Microbiology*, 57(1), 369-394.
- Shentu, X., Zhan, X., Ma, Z., Yu, X., & Zhang, C. (2014). Antifungal activity of metabolites of the endophytic fungus *Trichoderma brevicompactum* from garlic. *Brazilian journal of microbiology*, 45, 248-254.

- Bayan, L., Koulivand, P. H., & Gorji, A. (2014). Garlic: a review of potential therapeutic effects. *Avicenna journal of phytomedicine*, 4(1), 1.
- Jung, I. C., & Sohn, H. Y. (2014). Antioxidation, antimicrobial and antithrombosis activities of aged black garlic (*Allium sativum* L.). *Microbiology and Biotechnology Letters*, 42(3), 285-292.
- Sato, E., Kohno, M., Hamano, H., & Niwano, Y. (2006). Increased anti-oxidative potency of garlic by spontaneous short-term fermentation. *Plant foods for human nutrition*, 61, 157-160.
- Ryu, K., Ide, N., Matsuura, H., & Itakura, Y. (2001). N α -(1-deoxy-d-fructos-1-yl)-l-arginine, an antioxidant compound identified in aged garlic extract. *The Journal of nutrition*, 131(3), 972S-976S.
- Bayan, L., Koulivand, P. H., & Gorji, A. (2014). Garlic: a review of potential therapeutic effects. *Avicenna journal of phytomedicine*, 4(1), 1.
- Dong, M., Yang, G., Liu, H., Liu, X., Lin, S., Sun, D., & Wang, Y. (2014). Aged black garlic extract inhibits HT29 colon cancer cell growth via the PI3K/Akt signaling pathway. *Biomedical Reports*, 2(2), 250-254.
- Zong, A., Cao, H., & Wang, F. (2012). Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. *Carbohydrate polymers*, 90(4), 1395-1410.
- Lee, Y. M., Gweon, O. C., Seo, Y. J., Im, J., Kang, M. J., Kim, M. J., & Kim, J. I. (2009). Antioxidant effect of garlic and aged black garlic in animal model of type 2 diabetes mellitus. *Nutrition research and practice*, 3(2), 156-161.
- Chen, Y. C., Kao, T. H., Tseng, C. Y., Chang, W. T., & Hsu, C. L. (2014). Methanolic extract of black garlic ameliorates diet-induced obesity via regulating adipogenesis, adipokine biosynthesis, and lipolysis. *Journal of Functional Foods*, 9, 98-108.
- 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*, 9(1), 30-36.

Jung, E. S., Park, S. H., Choi, E. K., Ryu, B. H., Park, B. H., Kim, D. S., ... & Chae, S. W. (2014). Reduction of blood lipid parameters by a 12-wk supplementation of aged black garlic: a randomized controlled trial. *Nutrition*, *30*(9), 1034-1039.

Park, C., Gweon, O. C., Choi, Y. H., & Kim, J. I. (2009). Aged black garlic inhibits cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production by phorbol 12-myristate-13-acetate through inactivation of nuclear factor-kappaB.

Purev, U., Chung, M. J., & Oh, D. H. (2012). Individual differences on immunostimulatory activity of raw and black garlic extract in human primary immune cells. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, *34*(4), 651-660.

Uranchimeg Purev, U. P., Chung MiJa, C. M., & Oh DeogHwan, O. D. (2012). Individual differences on immunostimulatory activity of raw and black garlic extract in human primary immune cells.

Kim, D. G., Kang, M. J., Hong, S. S., Choi, Y. H., & Shin, J. H. (2017). Antiinflammatory effects of functionally active compounds isolated from aged black garlic. *Phytotherapy research*, *31*(1), 53-61.

Shin, J. H., Lee, C. W., Oh, S. J., Yun, J., Kang, M. R., Han, S. B., ... & Kang, J. S. (2014). Hepatoprotective effect of aged black garlic extract in rodents. *Toxicological research*, *30*, 49-54.

Kim, D. G., Kang, M. J., Hong, S. S., Choi, Y. H., & Shin, J. H. (2017). Antiinflammatory effects of functionally active compounds isolated from aged black garlic. *Phytotherapy research*, *31*(1), 53-61.

Amor, S., González-Hedström, D., Martín-Carro, B., Inarejos-García, A. M., Almodóvar, P., Prodanov, M., ... & Granada, M. (2019). Beneficial effects of an aged black garlic extract in the metabolic and vascular alterations induced by a high fat/sucrose diet in male rats. *Nutrients*, *11*(1), 153.

Hermawati, E., Sari, D. C. R., & Partadiredja, G. (2015). The effects of black garlic ethanol extract on the spatial memory and estimated total number of pyramidal cells of the hippocampus of monosodium glutamate-exposed adolescent male Wistar rats. *Anatomical Science International*, *90*, 275-286.

Wang, Z. D., Huang, C., Li, Z. F., Yang, J., Li, B. H., Liang, R. R., ... & Liu, Z. W. (2010). Chrysanthemum indicum ethanolic extract inhibits invasion of hepatocellular carcinoma via regulation of MMP/TIMP balance as therapeutic target. *Oncology reports*, 23(2), 413-421.

Aminuddin, M., Partadiredja, G., & Sari, D. C. R. (2015). The effects of black garlic (*Allium sativum* L.) ethanol extract on the estimated total number of Purkinje cells and motor coordination of male adolescent Wistar rats treated with monosodium glutamate. *Anatomical Science International*, 90, 75-81.

Tran, G. B., Dam, S. M., & Le, N. T. T. (2018). Amelioration of single clove black garlic aqueous extract on dyslipidemia and hepatitis in chronic carbon tetrachloride intoxicated Swiss Albino mice. *International Journal of Hepatology*, 2018.

Zheng, L., Lv, R., Huang, J., Jiang, D., Liu, X., & Hsiang, T. (2010). Integrated control of garlic leaf blight caused by *Stemphylium solani* in China. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 32(2), 135-145.

Prachayawarakorn, S., Sawangduanpen, S., Saynampheung, S., Poolpatarachewin, T., Soponronnarit, S., & Nathakarakule, A. (2004). Kinetics of colour change during storage of dried garlic slices as affected by relative humidity and temperature. *Journal of Food Engineering*, 62(1), 1-7.

Whitfield, F. B., & Mottram, D. S. (1992). Volatiles from interactions of Maillard reactions and lipids. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 31(1-2), 1-58.

Kutyrev, A. A., & Moskva, V. V. (1991). Nucleophilic reactions of quinones. *Russian Chemical Reviews*, 60(1), 72.

Maillard, M. N., Billaud, C., Chow, Y. N., Ordonaud, C., & Nicolas, J. (2007). Free radical scavenging, inhibition of polyphenoloxidase activity and copper chelating properties of model Maillard systems. *LWT-Food Science and Technology*, 40(8), 1434-1444.

Pedreschi, R., Campos, D., Noratto, G., Chirinos, R., & Cisneros-Zevallos, L. (2003). Andean yacon root (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. Endl) fructooligosaccharides as a potential novel source of prebiotics. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(18), 5278-5284.

Van der Meulen, R., Makras, L., Verbrugghe, K., Adriany, T., & De Vuyst, L. (2006). In vitro kinetic analysis of oligofructose consumption by *Bacteroides* and *Bifidobacterium* spp. indicates different degradation mechanisms. *Applied and environmental microbiology*, 72(2), 1006-1012.

Munoz, M., Mosquera, A., Alméciga-Díaz, C. J., Melendez, A. P., & Sánchez, O. F. (2012). Fructooligosaccharides metabolism and effect on bacteriocin production in *Lactobacillus* strains isolated from ensiled corn and molasses. *Anaerobe*, 18(3), 321-330.

Mani-López, E., García, H. S., & López-Malo, A. (2012). Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. *Food Research International*, 45(2), 713-721.

Taylor, T. M., RolfJoerger, E. P., Lopez-Malo, A., Avila-Sosa, R., & Calix-Lara, T. (2012). Organic Meat Production and Processing.

Beres, C., Costa, G.N.S., Cabezudo, I., da Silva-James, N.K., Teles, A.S.C., Cruz, A.P.G., Mellinger-Silva, C., Tonon, R.V., Cabral, L.M.C., Freitas, S.P., Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: a review. *Waste Manage.* 68, 581–594 (2017)

Cosme, F., Pinto, T., Vilela, A., Phenolic compounds and antioxidant activity in grape juices: a chemical and sensory view. *Beverages* 4, 22 (2018)

Teixeira, A., Baenas, N., Dominguez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno, D.A., Garcia-Viguera, C., Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: a review. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 15638–15678 (2014)

Salvador, Â.C., Simões, M.M.Q., Silva, A.M.S., Santos, S.A.O., Rocha, S.M., Silvestre, A.J.D., Vine waste valorisation: integrated approach for the prospection of bioactive lipophilic phytochemicals. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 4239 (2019)

Dani, C., Bonatto, D., Salvador, M., Pereira, M.D., Henriques, J.A.P., Eleutherio, E., Antioxidant protection of resveratrol and catechin in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Agric. Food Chem.* 56, 4268–4272 (2008)

Adams, D.O. Phenolics and ripening in grape berries, *Am. J. Enol. Viticult.* (2006)

Tinello, F., Lante, A., Evaluation of antibrowning and antioxidant activities in unripe grapes recovered during bunch thinning. *Aust. J. Grape Wine Res.* 23, 33–41 (2017)

Ş Kivrak, İ Kivrak, E. Karababa, Nutritional value, phenolic, vitamin and mineral contents of a fermented beverage from grapes of 'Merlot' and 'Cabernet Sauvignon'. *MITTEILUNGEN KLOSTERNEUBURG* 66, 255–265 (2016)

Chaisawadi, S., Methawiriyasilp, W., Thongbute, D., Chayawattana, T., clean production of commercial freeze-dried lime powder for medicinal herb and nutritional health benefits, in, *International Society for Horticultural Science (ISHS)*, Leuven, Belgium, pp. 29–35 (2005)

Singh, N., Yarla, N.S., Siddiqi, N.J., de Lourdes Pereira, M., Sharma, B., Features, pharmacological chemistry, molecular mechanism and health benefits of lemon, *medicinal chemistry (Sharīqah (United Arab Emirates))*, 17, 187–202 (2021)

Chiorcea-Paquim, A.-M., Enache, T.A., De Souza Gil, E., Oliveira-Brett, A.M., Natural phenolic antioxidants electrochemistry: towards a new food science methodology. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 19, 1680–1726 (2020)

Ş Kivrak, T. Göktürk, İ Kivrak, Determination of phenolic composition of *Tilia Tomentosa* flowers using UPLC-ESI-MS/MS. *Int. J. Second. Metab.* 4, 249–256 (2017)

Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J.P., Tognolini, M., Borges, G., Crozier, A., Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 1818–1892 (2013)

Singh, B., J.P. Singh, A. Kaur, N. Singh, Phenolic composition, antioxidant potential and health benefits of citrus peel. *Food Res. Int.* 132, 109114 (2020)

Ş Kivrak, İ Kivrak, E. Karababa, Analytical evaluation of phenolic compounds and minerals of *Opuntia robusta* J.C. Wendl and *Opuntia fcus-barbarica* A. Berger. *Int. J. Food Prop.* 21, 229–241 (2018)

Fia, G., Gori, C., Bucalossi, G., Borghini, F., Zanoni, B., A naturally occurring antioxidant complex from unripe grapes: the case of Sangiovese (v. *Vitis vinifera*). *Antioxidants*, 7, 27 (2018)

Moldovan, C., Frumuzachi, O., Babotă, M., Barros, L., Mocan, A., Carradori, S. and Crișan, G. 2022. Therapeutic Uses and Pharmacological Properties of Shallot (*Allium ascalonicum*): A Systematic Review. *Frontiers in Nutrition*. 9: 903686. Doi: <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.903686>

The Observatory of Economic Complexity (OEC). 2020. Onions and Shallots, Fresh or Chilled. Retrieved on August 10, 2022 from the OEC website <https://oec.world/en/profile/hs/onions-and-shallots-freshor-chilled>

Saptana, Gunawan, E., Perwita, A. D., Sukmaya, S. G., Darwis, V., Ariningsih, E. and Ashari. 2021. The Competitiveness Analysis of Shallot in Indonesia: A Policy Analysis Matrix. *PloS One*. 16(9): e0256832. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256832>.

Wongmekiat, O., Leelarugrayub, N. and Thamprasert, K. 2008. Beneficial Effect of Shallot (*Allium ascalonicum* L.) Extract on Cyclosporine Nephrotoxicity in Rats. *Food Chemical Toxicology* 46(5): 1844-1850. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.01.029>.

Wan, Q., Li, N., Du, L., Zhao, R., Yi, M., Xu, Q., and Zhou, Y., *Allium* vegetable consumption and health: An umbrella review of meta-analyses of multiple health outcomes, *Food Sci. Nutr.*, 2019, 7, 2451–2470.

Z. Bahadoran, P. Mirmiran, A. A. Momenan and F. Azizi, *Allium* vegetable intakes and the incidence of cardiovascular disease, hypertension, chronic kidney disease, and type 2 diabetes in adults, *J. Hypertens.*, 2017, 35, 1909– 1916

Setyadjit and Sukasih, E. 2015. Effect of Addition of Filler on the Production of Shallot (*Allium Cepa* Var. *Ascalonicum* L.) Powder with Drum Dryer. *Procedia Food Science*. 3: 396-408. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2015.01.044>.

Kang, O. J. 2016. Physicochemical Characteristics of Black Garlic After Different Thermal Processing Steps. *Preventive Nutrition and Food Science*. 21(4): 348-354. Doi: <https://doi.org/10.3746/pnf.2016.21.4.398>.

Tran, G. B., Pham, T. V. and Trinh, N. N. 2019. Black Garlic and Its Therapeutic Benefits. In Hassan BAR (Ed.). Medicinal Plants - Use in Prevention and Treatment of Diseases, 85042. London: Intech Open Doi: <https://doi.org/10.5772/intechopen.85042>

Nascimento, R., Canteri, M., Rodrigues, S. A. and Bittencourt, J. 2021. Optimization of Processing Parameters to Control Maillard Browning in Ready-To-Eat Processed Potatoes. Food Science and Technology International = Ciencia y tecnologia de los alimentos internacional. 27(8): 764-775. Doi: <https://doi.org/10.1177/1082013220984295>.

Moreno-Rojas, J. M., Moreno-Ortega, A., Ordóñez, J. L., Moreno-Rojas, R., Pérez-Aparicio, J. and Pereira-Caro, G. 2018. Development and Validation of UHPLC-MS/MS Methodology for the Determination of Flavonoids, Amino Acids and Organosulfur Compounds in Black Onion, a Novel Derived Product from Fresh Shallot Onions (*Allium cepa* var. *aggregatum*). LWT - Food Science and Technology. 97: 376-383. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.032>.

Nugrahedhi, P. Y., Dekker, M., Widianarko, B., & Verkerk, R. (2016). Quality of cabbage during long term steaming; phytochemical, texture and colour evaluation. *LWT-Food Science and Technology*, 65, 421-427.

Galeone, C., Tavani, A., Pelucchi, P., Negri E. and La Vecchia C., Allium vegetable intake and risk of acute myocardial infarction in Italy, *Eur. J. Nutr.*, 2009, 48, 120–123.

Zhao, X.-X., Lin, F.-J., Li, H., Li, H.-B., Wu, D.-T., Geng, F., Ma, W., Wang, Y., Miao, B.-H. and Gan, R.-Y. Recent Advances in Bioactive Compounds, Health Functions, and Safety Concerns of Onion (*Allium cepa* L.), *Front. Nutr.*, 2021, 8, 1–23.

Shang, A., Cao, S.-Y., Xu, X.-Y., Gan, R.-Y., Tang, G.-Y., Corke, H., Mavumengwana, V. and Li, H.-B. Bioactive Compounds and Biological Functions of Garlic (*Allium sativum* L.), *Foods*, 2019, 8, 1–31.

Patel, R. V., Mistry, B. M., Shinde, S. K., Syed, R., Singh, V. and Shin, H. S. Therapeutic potential of quercetin as a cardiovascular agent, *Eur. J. Med. Chem.*, 2018, 155, 889–904.

Miękus, N., Marszałek, K., Podlacha, M., Iqbal, A., Puchalski, C. and Świergiel, A. H. Health Benefits of Plant-Derived Sulfur Compounds, Glucosinolates, and Organosulfur Compounds, *Molecules*, 2020, 25, 1–22.

Vazquez-Prieto, M. A., and Miatello, R. M., Organosulfur compounds and cardiovascular disease, *Mol. Aspects Med.*, 2010, 31, 540–545.

Walag, A. M. P., Ahmed, O., Jeevanandam, J., Akram, M., Ephraim-Emmanuel, B. C., Egbuna, C., Semwal, P., Iqbal, M., Hassan, S. and Uba, J. O. *Functional Foods and Nutraceuticals*, Springer, Cham, 2020, pp. 445–472.

Won, Y. S. Method for producing aged black onion, involves putting onion in stainless aging plate, where onion is heat-treated, where heat-treated onion is aged at medium-temperature-All Databases, KR858317-B1, 2008, <https://www.webofscience.com/wos/alldb/full-record/DIIDW:2009E55775>.

Moreno-Ortega, A., Pereira-Caro, G., Ordóñez, J. L., Muñoz-Redondo, J. M., Moreno-Rojas, R., Pérez-Aparicio, J., and Moreno-Rojas, J. M. Changes in the antioxidant activity and metabolite profile of three onion varieties during the elaboration of ‘black onion’, *Food Chem.*, 2020, 311, 1–9.

Goncharov, N., Orekhov, A. N., Voitenko, N., Ukolov, A., Jenkins, R. and Avdonin, P. in *Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity*, Elsevier Inc., 2016, pp. 555–568.

Rein, M. J., Renouf, M., Cruz-Hernandez, C., Actis-Goretta, L., Thakkar, S. K. and da Silva Pinto, M. Bioavailability of bioactive food compounds: A challenging journey to bioefficacy, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 2013, 75, 588–602.

Pellegrini, M., Lucas-Gonzalez, R., Fernández-López, J., Ricci, A., Pérez-Álvarez, J. A., Lo Sterzo, C. and Viuda-Martos, M. Bioaccessibility of polyphenolic compounds of six quinoa seeds during in vitro gastrointestinal digestion, *J. Funct. Foods*, 2017, 38, 77–88.

Moreno-Ortega, A., Ordoñez-Díaz, J. L., Moreno-Rojas, J. M., Moreno-Rojas R., and Pereira-Caro, G. Changes in the Organosulfur and Polyphenol Compound Profiles of Black and Fresh Onion during Simulated Gastrointestinal Digestion, *Foods*, 2021, 10, 1–16.

Pérez-Burillo, S., Molino, S., Navajas-Porras, B., ValverdeMoya, Á. J., Hinojosa-Nogueira, D., López-Maldonado, A., Pastoriza, S., and Rufián-Henares, J. Á. an in vitro batch fermentation protocol for studying the contribution of food to gut microbiota composition and functionality, *Nat. Protoc.*, 2021, 16, 3186–3209.

Ordoñez-Díaz, J. L., Moreno-Ortega, A., Roldán-Guerra, F. J., Ortíz-Somovilla, V., Moreno-Rojas, J. M. and Pereira-Caro, G. In Vitro Gastrointestinal Digestion and Colonic Catabolism of Mango (*Mangifera indica* L.) Pulp Polyphenols, *Foods*, 2020, 9, 1836.

Pereira-Caro, G., Ordóñez-Díaz, J. L., de Santiago, E., Moreno-Ortega, A., Cáceres-Jiménez, S., Sánchez-Parra, M., Roldán-Guerra, F. J., Ortiz-Somovilla V. and MorenoRojas, J. M. Antioxidant Activity and Bio-Accessibility of Polyphenols in Black Carrot (*Daucus carota* L. ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) and Two Derived Products during Simulated Gastrointestinal Digestion and Colonic Fermentation, *Foods*, 2021, 10, 1–18.

Mills, C. E., Tzounis, X., Oruna-Concha, M. J., Mottram, D. S., Gibson, G. R. and Spencer, J. P. E. In vitro colonic metabolism of coffee and chlorogenic acid results in selective changes in human faecal microbiota growth, *Br. J. Nutr.*, 2015, 113, 1220–1227.

Juániz, I., Ludwig, I. A., Bresciani, L., Dall'Asta, M., Mena, P., Del Rio, D. Cid, C. and de Peña, M. P. Catabolism of raw and cooked green pepper (*Capsicum annuum*) (poly)phenolic compounds after simulated gastrointestinal digestion and faecal fermentation, *J. Funct. Foods*, 2016, 27, 201–213.

Juániz, I., Ludwig, I. A., Bresciani, L., Dall'Asta, M., Mena, P., Del Rio, D. Cid, C. and de Peña, M. P. Bioaccessibility of (poly)phenolic compounds of raw and cooked cardoon (*Cynara cardunculus* L.) after simulated gastrointestinal digestion and fermentation by human colonic microbiota, *J. Funct. Foods*, 2017, 32, 195–207.

Mosele, J. I., Macià, A., Romero, M. P., Motilva, M. J. and Rubió, L. Application of in vitro gastrointestinal digestion and colonic fermentation models to pomegranate products (juice, pulp and peel extract) to study the stability and catabolism of phenolic compounds, *J. Funct. Foods*, 2015, 14, 529–540.

Chiou, Y. S., Wu, J. C., Huang, Q., Shahidi, F., Wang, Y. J., Ho, C. T. and Pan, M. H. Metabolic and colonic microbiota transformation may enhance the bioactivities of dietary polyphenols, *J. Funct. Foods*, 2014, 7, 3–25.

Ozdal, T., Sela, D. A., Xiao, J., Boyacioglu, D., Chen, F. and Capanoglu, E. The Reciprocal Interactions between Polyphenols and Gut Microbiota and Effects on Bioaccessibility, *Nutrients*, 2016, 8, 1–36.