Utjecaj oksidacije na antimikrobni učinak vina

Galiotović, Anaanđela

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:536554

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO TEHNOLOŠKI FAKULTET

I

MEDICINSKI FAKULTET

Anaanđela Galiotović

UTJECAJ OKSIDACIJE NA ANTIMIKROBNI UČINAK VINA

Diplomski rad

Akademska godina: 2016./ 2017.

Mentorica:

doc. dr. sc. Ivana Mudnić, dr. med.

Split, listopad, 2017.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO TEHNOLOŠKI FAKULTET

I

MEDICINSKI FAKULTET

Anaanđela Galiotović

UTJECAJ OKSIDACIJE NA ANTIMIKROBNI UČINAK VINA

Diplomski rad

Akademska godina: 2016./ 2017.

Mentorica:

doc. dr. sc. Ivana Mudnić, dr. med.

Split, listopad, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet
Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA
Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska

Znanstveno područje:	Biomedicinske znanosti
Znanstveno polje:	Farmacija
Nastavni predmet:	Medicinska kemija i biokemija
Tema rada	je prihvaćena na sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na . sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta i sjednici fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta
Mentor:	doc. dr. sc. Ivana Mudnić, dr. med.
Pomoć pri izradi:	Mia Grga, mag. ing. chem. ing.

Utjecaj oksidacije na antimikrobni učinak vina

Anaanđela Galiotović, broj indeksa 87

Sažetak: Cilj: Iako se prilikom pijenja vina često događa da vino stoji u otvorenoj boci te je podložno oksidaciji do sada je u potpunosti neistraženo utječe li oksidacija na biološke učinke vina. Stoga su ciljevi ovog istraživanja bili utvrditi dolazi li do promjene antimikrobnog učinka maceriranog bijelog vina Graševine nakon spontane oksidacije tijekom 48 sati; ispitati utječe li spontana 48-satna oksidacija vina na njegov biokemijski sastav i antioksidacijski učinak *in vitro* te usporediti promjene antimikrobnog i antioksidacijskog učinka vina.

Materijali i metode: Macerirano bijelo vino Graševina Kuvlakhe, vinarija Krauthaker, Kutjevo, berba 2015. godine proizvedeno je postupkom u kojem se spontana fermentacija grožđanog soka odvijala u dodiru s biljnim materijalom. Nakon toga su se bez uklanjanja sjemenki i pokožica grožđa, tankovi vina hermetički zatvorili omogućavajući vinu daljnje sazrijevanje pri konstantnoj temperaturi i bez doticaja sa zrakom tijekom 120 dana. Oksidirano macerirano bijelo vino dobilo se nakon otvaranje boce izlaganjem zraku tijekom 48 sati. Sadržaj i sastav ukupnih fenola određen je spektrofotemetrijskim metodama. Antioksidacijski učinci mjereni su FRAP (engl. Ferric reducing antioxidant power) metodom, a enološki fizikalno-kemijski parametri standardnim enološkim metodama. Antimikrobni učinak ispitan je inokulacijom bakterijskih suspenzija s vinom na ploče s krvim agarom u unaprijed određenim vremenskim razmacima, u duplikatu. Nakon 24-satne inkubacije vizualno se vršila detekcija bakterijskih kolonija, do pronalaska ploče s izostankom vidljivog porasta.

Rezultati: Spontana oksidacija značajno je promijenila sadržaj ukupnih fenola, te pojedinih fenolnih skupina. Sadržaj je ukupnih fenola i flavonoida bio veći nakon oksidacije. Oksidacija je povećala i sadržaj ukupnih flavanola, a smanjila sadržaj monomernih spojeva i ne-flavonoida. Oba su ispitivana uzorka vina ostvarila antibakterijski učinak protiv *E. coli* i S. *enterica*, serovar *Enteritidis*. Intaktno je macerirano vino pokazalo superiorniju antibakterijsku aktivnost u odnosu na oksidirano macerirano vino na obje bakterijske vrste, s vremenom inkubacije koje je bilo različito za svaku kombinaciju uzorka vina i bakterijske vrste.

Zaključci: Spontana je oksidacija vina izazvala suprotne promjene u različitim biološkim učincima; antimikrobni se učinak smanjuje, a antioksidacijski povećava. Ove su promjene su donekle povezane sa promjenama u biokemijskom sastavu oksidiranog vina.
Rad je proveden u sklopu istraživačkog projekta 8652 Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ) „Biološki učinci vina: utjecaj vinifikacijske tehnologije, dealkoholizacije i starenja vina“, voditelja prof. dr. sc. Mladena Bobana.

Ključne riječi: : bijelo vino, maceracija, oksidacija, vinski polifenoli, antioksidans, *E. coli*, *S. enterica* serovar *Enteritidis*

Rad sadrži: 61 stranicu, 16 slika, 2 tablice, 67 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. prof. dr. sc. Mladen Boban, predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš-Čulić, član
3. doc. dr. sc. Ivana Mudnić, član mentor

Datum obrane: 06. listopada 2017.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35 i Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 2

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy
University of Split, Croatia

Scientific area:	Biomedical sciences
Scientific field:	Pharmacy
Course title:	Medical Chemistry and Biochemistry
Thesis subject:	was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. and Faculty Council of School of Medicine, session no.
Mentor:	doc. dr. sc. Ivana Mudnić, dr. med.
Technical assistence:	Mia Grga

The influence of oxidation on the antimicrobial effect of wine

Anaanđela Galiotović, 87

Summary: The research goal: It is completely unexplored whether the oxidation affects the biological effects of the wine, although it often happens that while drinking wine, we open the bottle and the wine remains in the open bottle susceptible to oxidation. Therefore, the aims of this study were to determine the antimicrobial effect of macerated white Graševina after spontaneous oxidation for 48 hours; to examine whether wine oxidation affects its biochemical composition and antioxidant effect in vitro and to compare the changes in antimicrobial and antioxidant effects induced by wine oxidation

Materials and Methods: Macerated white wine Graševina Kuvlakhe, Krauthaker winery, Kutjevo, vintage 2015, was produced by process of spontaneous grape fermentation of fermented juice in contact with plant material. Without removing grape seeds and skins, the wine tanks were hermetically closed, allowing wine maturation at constant temperature and without contact with the air for 120 days. Oxidized macerated white wine was obtained after opening the bottle by exposing the wine to the air for 48 hours. The content and composition of the total phenols is determined spectrophotometrically. Antioxidant effects were measured by FRAP (Ferric reducing antioxidant power) method, and enological physical-chemical parameters by standard enological methods. The antimicrobial effect was investigated by inoculation of bacterial suspensions with wine on blood agar plates at predetermined time intervals, in duplicate. After 24-hour incubation, visualization of bacterial colonies was performed until the plate with no apparent bacterial growth was found.

Results: Spontaneous oxidation significantly changed the content of total phenols and certain phenolic groups. The content of total phenols and flavonoids was higher after oxidation. Oxidation also increased the content of total flavanols, and reduced the content of monomeric compounds and non-flavonoids. Both of the tested wine samples showed antibacterial effect against E. coli and S. enterica, serovar Enteritidis. The intact macerated wine

showed superior antibacterial activity relative to oxidized macerated wine against both bacterial species with incubation time different for each combination of wine and bacterial species.

Conclusions: Spontaneous oxidation of wine caused opposite changes in various biological effects; the antimicrobial effect decreased and antioxidant increased. These changes are somewhat related to changes in the biochemical composition of oxidized wine.

This work was supported by Croatian Science Foundation (HRZZ), project 8652 "Biological effects of wine: the influence of vinification technology, dealcoholization and aging of wine", project leader prof. Mladen Boban.

Keywords: white wine, maceration, oxidation, wine polyphenols, antioxidant, E. coli, S. enterica serovar Enteritidis

Thesis contains: 61 pages, 16 figures, 2 tables, 67 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Mladen Boban, PhD, full professor, chair person
2. Vedrana Čikes-Čulić, PhD, associate professor, member
3. Ivana Mudnić, PhD, assistant professor, supervisor

Defence date: 6th October 2017.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35 and Library of School of Medicine, Šoltanska 2.

Sadržaj

Sadržaj 1

1. UVOD 4

1.1. Vino 5

1.2. Graševina 8

1.3. Fenolni spojevi u vinu 10

1.3.1. Flavonoidi 11

1.3.2. Ne-flavonoidi 14

1.4. Vinifikacijski procesi 14

1.4.1. Fermentacija 14

1.4.2. Maceracija vina 15

1.4.3. Oksidacija vina 16

1.5. Antimikrobni učinci vina 18

1.6. Uzročnici hranom prenosivih infekcija 19

1.6.1. *Escherichia Coli* 19

1.6.2. *Salmonella Enterica* 21

2. CILJ ISTRAŽIVANJA 23

3. MATERIJALI I METODE 25

3.1. Priprema uzoraka vina 26

3.2. Biokemijska analiza testnih uzoraka 27

3.2.1. Standardna enološka analiza vina 27

3.2.2. Analiza fenolnih spojeva 28

3.2.3. Antioksidativni kapacitet 28

3.2.4. Reagensi i kemikalije 29

3.3. Mikrobiološka analiza 29

3.4. Statistička analiza 30

4. REZULTATI 32

4.1. Antibakterijska aktivnost 33

4.1.1. *Escherichia coli* 33

4.1.2. *Salmonella enteritidis* 34

4.2. Biokemijska analiza vina 35

5. RASPRAVA 37

6. ZAKLJUČAK 41

7. LITERATURA 43

8. SAŽETAK 48

9. SUMMARY 51

10. ŽIVOTOPIS 54

ZAHVALA

Zahvaljujem od srca dragoj mentorici Ivani Mudnić i asistentici Miji Grgi, bez čije pomoći i strpljenja ne bi bilo ovog rada.

Zahvaljujem mami i tati, sestri i bratu na beskrajnoj ljubavi i razumijevanju koje su mi pružili tijekom cijelog mog obrazovanja.

Zahvaljujem svojim prijateljima na beskonačnoj podršci i divnom prijateljstvu proteklih 5 godina.

1. UVOD

Rezultati epidemioloških studija upućuju kako umjerena konzumacija vina povoljno utječe na ljudsko zdravlje (1)(2). Važan biološki učinak vina je antimikrobna aktivnost protiv niza patogena, uzročnika hranom prenosivih infekcija, koja je pokazana u in vitro studijama (3). Smatra se da su uz alkohol, polifenoli najodgovorniji za antimikrobnu aktivnost vina, a točan mehanizam ovog učinka nije u potpunosti razjašnjen. Zbog velikih razlika u kemijskom sastavu očekivano je da će se i njihovi biološki učinci razlikovati. Na kemijski sastav vina značajno utječu promjene u načinu proizvodnje vina, na primjer vrijeme maceracije. Tijekom početne obrade grožđa te maceracije i fermentacije grožđanog soka u dodiru s biljnim materijalom (sjemenkama i pokožicama grožđa) polifenoli se oslobađaju u vino i važni su u složenim procesima sazrijevanja vina. Zajedno s drugim sastojcima vina polifenoli značajno utječu na organoleptička svojstva i uvjetuju kvalitetu vina (4).

Okolišni čimbenici kojima je vino izoženo mogu utjecati na fizikalno-kemijska svojstva polifenola, kemijsku stabilnost, topljivost, sklonost polimeriziranju i taloženju te reakciju s proteinima. Sve to može dovesti do promjena u biokemijskom sastavu i svojstvima vina, a posljedično i do promjena u biološkoj aktivnosti vina (5). Nakon otvaranja boce vina, vino je u doticaju sa zrakom i podložno je oksidaciji. Oksidacijske su reakcije posebno izražene u vinima koja su proizvedena po principima ekološke proizvodnje i nisu zaštićena konzervansima.

Iako se prilikom pijenja vina često događa da vino stoji u otvorenoj boci te je podložno oksidaciji do sada je u potpunosti neistraženo utječe li oksidacija na biološke učinke vina.

1.1. Vino

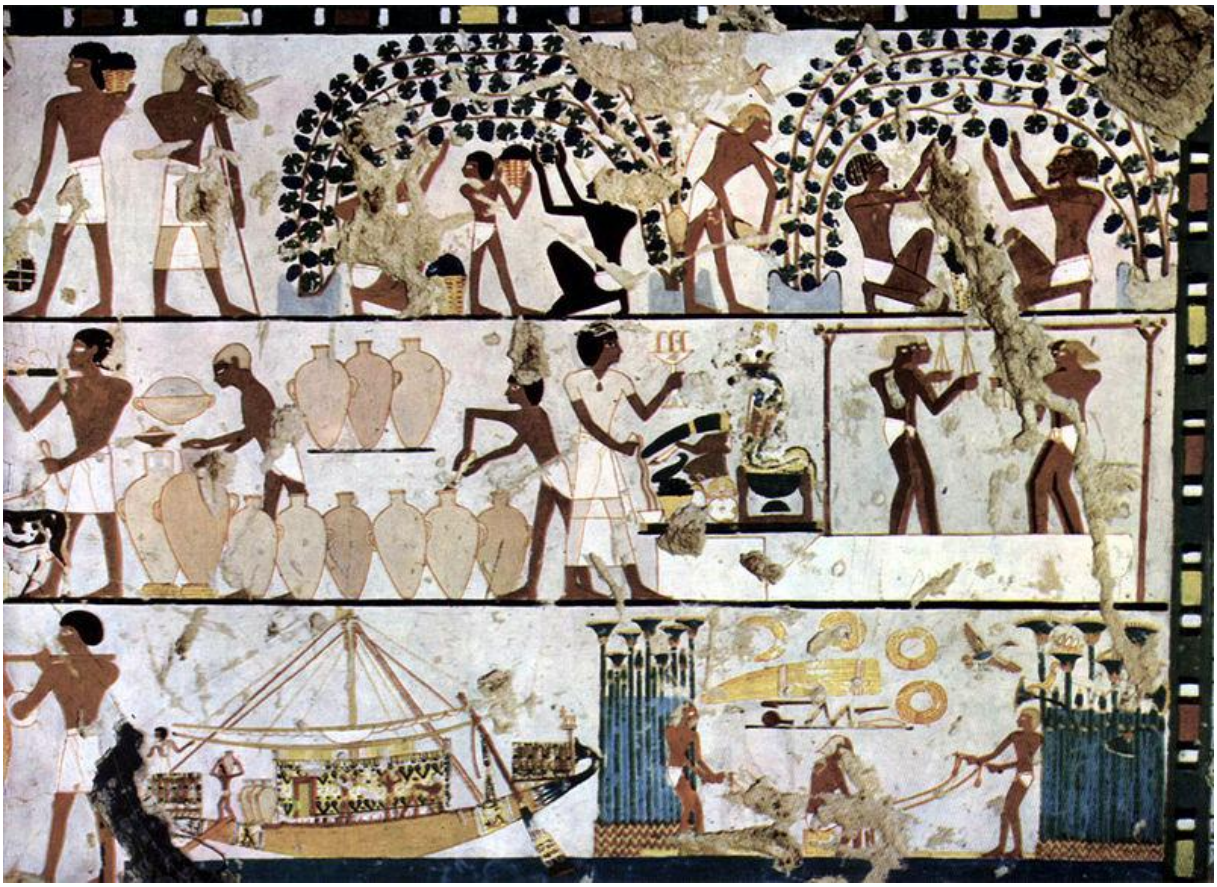
Vino, poljoprivredno-prehrambeni proizvod, dobiven potpunim ili djelomičnim alkoholnim vrenjem masulja ili mošta, od svježeg i, za preradbu u vino, pogodnoga grožđa (zdravo, zrelo, prezrelo, prosušeno ili prirodno smrznuto grožđe, plod priznatih kultivara vinove loze ili njezinih križanaca namijenjenih proizvodnji vina) (6). Vino je piće velike kemijske složenosti. Ono je vodeno-alkoholna otopina (≈78% vode) koja uključuje veliku raznolikost kemijskih sastojaka, uključujući uz alkohol i aldehide, estere, ketone, lipide, minerale, organske kiseline, fenole, topljive proteine, šećere i vitamine (7).

Vino je povezano s drevnim povijesnim razvojem ljudske kulture. Najstariji podaci o korištenju proizvoda od vinove loze od strane čovjeka potječu još iz 3500.-1900. godine prije Krista (8).

Pitanje kada se pojavilo prvo vino na svijetu vjerojatno neće nikada dobiti jasan odgovor, iako neki istraživači čak tvrde da je otkriveno prije nego što se civilizacija počela razvijati tijekom prapovijesti (9).

Danas je poznato da je divlja loza (*Vitis sylvestris*) postojala na cijelom mediteranskom području i najvjerojatnije je došlo do otkrića vina istovremeno na različitim mjestima neovisno jedan o drugome. Prva društva bili su lovci/ sakupljači i vjerojatno su slučajno otkrili vino. Sok od grožđa po prirodi sadrži vinsku kiselinu koja sprječava neželjeno kvarenje namirnice. Ova činjenica čini sok od grožđa savršenim supstratom za alkoholnu fermentaciju pomoću *Saccharomyces cerevisiae* i vrlo je vjerojatno da su prva organizirana društva otkrila vino kad su u nekom trenutku prikupili plodove i pohranili ih za potrošnju "izvan sezone". Tijekom skladištenja sok od grožđa je vjerojatno spontano fermentirao, a ondašnji ljudi otkrili su užitnost novonastalog pića (10).

Vino se proizvodilo na cijelom Mediteranu u antičko doba i brzo se proširilo. Vrlo je teško zamisliti našu civilizaciju i njezinu povijest bez vina. Antički Grci, Egipćani, Babilonci, Rimljani i drugi koristili su vino u svom svakodnevnom životu. Vino je također bio neophodan dio religioznih ceremonija. Drevni Grci imali su boga vina, Dionizija, a Rimljani Bacchusa. Danas je vino neophodan dio kršćanske liturgije jer se simbolično koristi tijekom euharistije (11).



Slika 1 Uzgoj grožđa, vinogradarstvo i trgovina u drevnom Egiptu, 1500. godina prije Krista.
Preuzeto sa: https://en.wikipedia.org/wiki/History_of_wine, 01.10.2017.

Od davnina je vino usko povezano s prehranom, posebice u mediteranskim zemljama Povijesni materijalni dokazi iz Sumerije i Egipta iz 2200. godine prije Krista sadrže recepte za lijekove na bazi vina, čineći vino najstarijim dokumentiranim ljudskim lijekom (12). Danas je vino važan dio naše kulture, svakodnevnog života i posebnih prigoda. U prošlosti se vino smatralo pićem privilegiranih bogatih staleža, ali se posljednjih godina zbog zdravstvenih prednosti potrošnja vina povećava.

Kako bi podatci o sastavu vina bili razumljivi i međusobno usporedivi, kemijske analize vina obavljaju se po istovjetnim postupcima koji su sastavni dio svakoga suvremenoga vinskog zakona (13). Neki od glavnih sastojaka u vinu su voda, etanol, glicerol, viši alkoholi (n-butanol, izobutanol, n-pentanol), organske kiseline (vinska, mliječna, octena kiselina), te polifenoli. Polifenoli, zbog kojih je vino proglašeno prehrambenim proizvodom, oko 10 puta su prisutniji u crnim vinima nego u bijelima. Nadalje, od estera u vinima najprisutniji je etilni ester octene kiseline, a od aldehida acetaldehid. Od dušikovih spojeva najveći dio čine aminokiseline. Koncentracija šećera i ostalih ugljikohidrata varira ovisno o tipu vina, a to su uglavnom heksoze, pentoze, pektini i dekstrini.(1)

Etanol je najznačajniji alkohol u vinu. Koncentracija etanola u vinu općenito iznosi od 78,90-118,35 g/l, ovisno uglavnom o sadržaju šećera i manje o temperaturi i soju kvasca (14).

Metanol je također prisutan u vinu (0,1-0,2 g/l). U vinu metanol nastaje enzimskom degradacijom pektina. Sadržaj metanola u vinu ovisi o broju čimbenika kao što su sorta i stanje, proces maceracije, temperatura fermentacije. *In vivo* oksidacija metanola proizvodi formaldehid i mravlju kiselinu koja je toksična za središnji živčani sustav. Zbog toga je sadržaj metanola jedan od kritičnih parametara kontrolne točke koji treba kontrolirati tijekom faze alkoholne fermentacije kako bi se proizvelo vino sigurno za ljudsku potrošnju (8).

Osim jednostavnih primarnih i viših alkohola, u vinu se nalaze i viševaljani alkoholi (polioli). Ti se spojevi odlikuju prisutnošću više hidroksilnih skupina u istoj molekulskoj strukturi. Najvažniji predstavnik je glicerol, koji je, uz vodu i etanol, najzastupljenija tvar u vinu, u koncentracijama od 5-20 g/l (15). Kao najvažniji sporedni proizvod alkoholne fermentacije značajno utječe na enološke karakteristike i užitnost vina, a pored etanola doprinosi porastu koncentracije urata u plazmi ljudi nakon konzumacije vina (16).

Tijekom posljednja dva desetljeća niz epidemioloških i kliničkih istraživanja istaknulo je da umjereni unos vina ima pozitivan učinak na antioksidacijski kapacitet, lipidni profil i koagulacijski sustav, što može biti povezano sa smanjenom incidencijom kardiovaskularnih i drugih bolesti bolesti te ukupne smrtnosti (17).

Veliki odjek u širokoj javnosti imale su televizijske emisije o epidemiološkim rezultatima kako je u Francuskoj smanjena stopa smrtnosti od kardiovaskularnih bolesti unatoč velikom unosu zasićenih masnoća životinjskog porijekla (18). Smatra se da je razlog ovom trendu činjenica da veliki broj Francuza redovito uz hranu umjereno pije uglavnom crno vino („francuski paradoks“, (19)).

1.2. Graševina

Bijelo vino je slamnato-žute, žuto-zelene ili žuto-zlatne boje. Proizvodi se alkoholnom fermentacijom neobojene pulpe grožđa, koja može imati pokožicu bilo koje boje (uobičajeno bijele). Povijesni tragovi upućuju da se bijelo vino proizvodi i konzumira barem 2500 godina.

Nakon branja i tiještenja grožđa, dobiveni grožđani sok se odvaja i stavlja u spremnike za fermentaciju gdje se šećeri pretvaraju u alkohole pomoću kvasaca prisutnih u grožđu (20).

Širok izbor bijelih vina proizlazi iz velikog broja sorti grožđa, nekolicine vinifikacijskih metoda i omjera preostalog šećera. Poznata bijela vina su Chardonnay,

Sauvignon, Riesling, Pošip, Malvazija, i dr. (21). U eksperimentalnom dijelu ovog diplomskog rada korištena je Graševina, najraširenija sorta bijeloga vina u kontinentalnom dijelu Hrvatske.

Graševina je izvorno sorta srednje Europe, poznata pod brojnim nazivima, Grašica, Laški rizling, Riesling italico, Wälsch Riesling, Rizling Vlašsky. Danas se uzgaja u Sloveniji, Mađarskoj, Austriji, Češkoj, Slovačkoj, Rumunjskoj, Albaniji, Kini i Brazilu pa čak i u Kanadi. (22). Graševina je aromatična sorta grožđa koja ima cvjetne, gotovo mirisne, arome i visoku kiselost (23). Koristi se za proizvodnju suhog, poluslatkog, slatkog i pjenušavog bijelog vina (12).

.



Slika 2 Graševina.
Preuzeto s http://www.krauthaker.hr/posjetite-nas/ (01.10.2017.)

1.3. Fenolni spojevi u vinu

U organskoj kemiji fenoli su klasa kemijskih spojeva koji se sastoje od hidroksilne skupine (-OH) vezane izravno na aromatsku ugljikovodičnu skupinu. Najjednostavnija klasa je fenol, koji se također naziva karbolna kiselina C_6H_5OH.

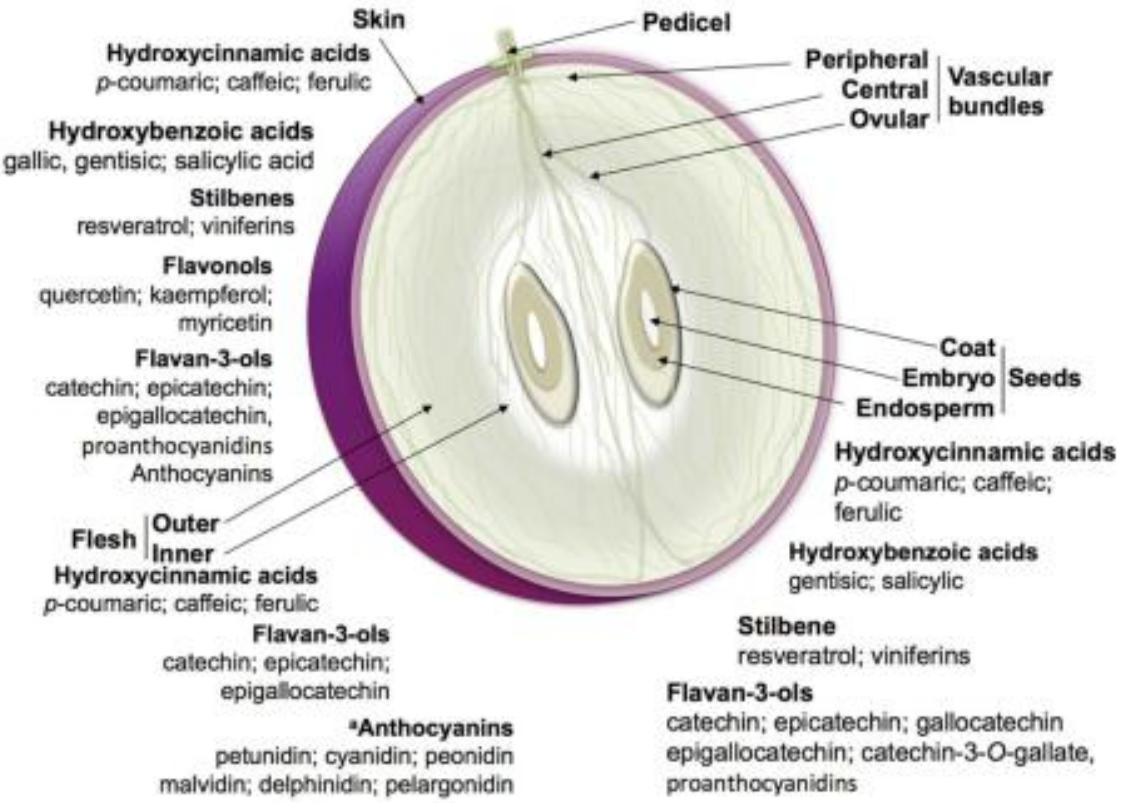
Klasificiraju se na više načina, a najbolje je na temelju njihovog broja fenolnih skupina. Stoga ih se može nazvati jednostavnim fenolima ili monofenolima, sa samo jednom fenolnom skupinom ili di- (bi-), tri- i oligofenolima, s dvije, tri ili više fenolnih skupina (24)(25).

Najveći i najbolje proučavani prirodni fenoli su flavonoidi, koji uključuju nekoliko tisuća različitih spojeva (26). Druga važna skupina vinskih fenola su ne-flavonoidi.

Grožđe, plod biljke Vitis vinifera biljka je bogata fenolima koji se distribuiraju u pokožici, stabljici, listu i sjemenkama grožđa, a ne njihovim sočnim srednjim dijelovima. Na slici 3 možemo vidjeti rapodjelu fenola u zreloj bobici grožđa (27).

Ukupni fenolni sadržaj grožđa varira s kultivarom, sastavom tla, klimom, zemljopisnim podrijetlom, te načinom uzgoja ili prisutnosti bolesti, kao što su gljivične infekcije.

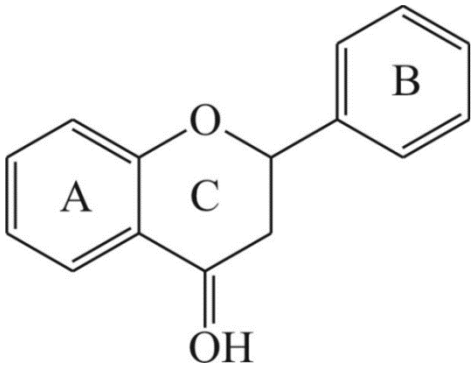
Razlike u ukupnom polifenolnom sadržaju između crnog i bijelog vina uvjetovane su dijelom razlikama u izvornoj biljnoj sirovini (grožđe) ali i razlikama u načinu proizvodnje crnog i bijelog vina. Fenolni spojevi utječu na organoleptička svojstva kao što su boja, gorčina, adstringencija i aroma, ali i na zdravstvenu kvalitetu vina. Bijela vina obično imaju desetak puta nižu koncentraciju fenolnih spojeva nego crna vina (28).



Slika 3 Shematski prikaz raspodjele fenola u zreloj bobici grožđa (27).

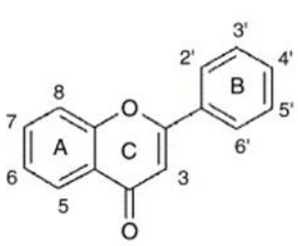
1.3.1. Flavonoidi

Flavonoidi su sveprisutni sastojci u fotosintetskim stanicama i široko su rasprostranjeni u biljnom carstvu. Oni se nalaze u voću, povrću, orasima, sjemenkama, stabljikama i cvijeću kao i u čaju, vinu, propolisu i medu i predstavljaju uobičajen sastojak ljudske prehrane. Funkcija flavonoida u cvijeću je pružanje boje koja privlači brojne biljne oprašivače. U listovima, vjeruje se da ovi spojevi omogućuju fiziološko preživljavanje biljke, štite od, na primjer, gljivičnih patogena i UV-B zračenje. Osim toga, flavonoidi su uključeni u fotosenzitizaciju, prijenos energije, učinak hormona rasta biljaka i regulatora rasta, kontrolu disanja i fotosinteze, morfogeneze i određivanje spola. Bazična strukturna značajka flavonoidnih spojeva je 2-fenil-benzo [α] piranska ili flavanska jezgra, koja se sastoji od dva prstena benzena (A i B) povezanih preko heterocikličkog prstena pirana (C) (Slika 4).

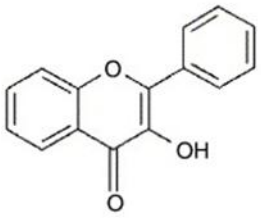


Slika 4 Struktura flavonoida.

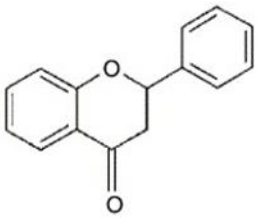
Flavonoidi se mogu svrstati u nekoliko skupina prema njihovim strukturama, što je prikazano na slici 5.



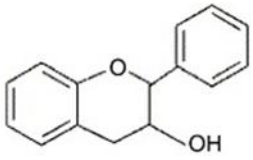
Flavones	**OH-substitution**
Flavone	-
5-hydroxyflavone	5
7-hydroxyflavone	7
Chrysin	5,7
7,8-dihydroxyflavone	7,8
Baicalein	5,6,7
Apigenin	5,7,4′
Luteolin	5,7,3′,4′



Flavonoles	
3-hydroxyflavone	3
Galangin	3,5,7
Kaempferol	3,5,7,4′
Fisetin	3,7,3′,4′
Morin	3,5,7,2′,4′
Quercetin	3,5,7,3′,4′
Myricetin	3,5,7,3′, 4′,5′



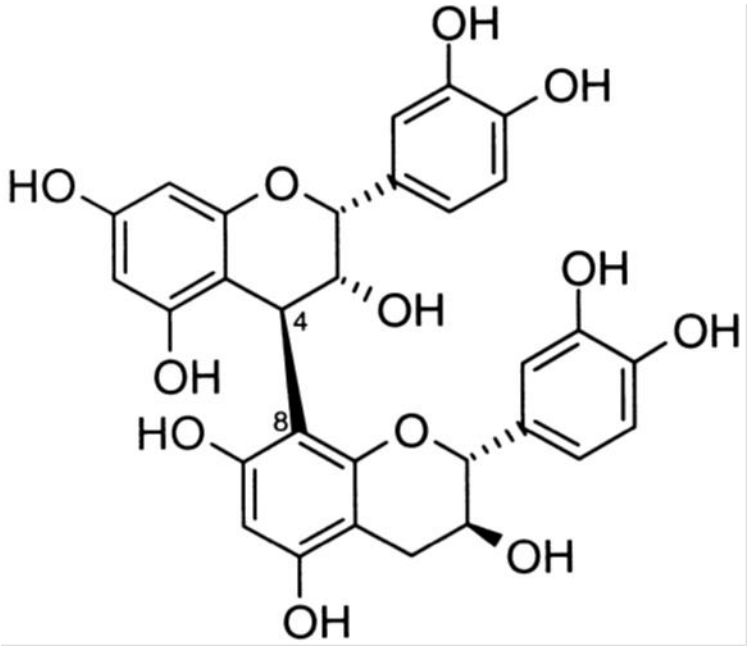
Flavanones	
6-hydroxyflavanone	6
Narigenin	5,7,4′
Eriodictyol	5,7,3′,4′
Taxifolin	3,5,7,3′,4′



Flavan-3-oles	
Catechin	3,5,7,3',4'

Slika 5 Glavne skupine flavonoida i predstavnici (29).

Flavanoli (flavan-3-oli ili katehini) dominiraju u sjemenkama grožđa, ali su prisutni u značajnim količinama i u pokožici, kao monomeri i polimeri. Uobičajeni monomeri prisutni u vinu su (+)-katehin, (-)-epikatehin, (-)-epigalokatehin (26). Spojevi koji nastaju polimerizacijom flavan-3-ola su oligomeri proantocijanidini i polimeri kondenzirani tanini. Kondenzacija dovodi do stvaranja kovalentne veze između monomera, najčešće između C4 i C8 ili C4 i C6 pozicija.



Slika 6 Procijanidin B1 (dimer epikatehina i katehina) (4)

Flavonoli su druga važna skupina flavonoida prisutnih u vinu. Glavni predstavnici su kaempferol, kvercetin, miricetin i izoramnetin, a uglavnom postoje kao derivati, glukozidi, galaktozidi i glukuronidi (27).

Antocijani su dominantni u crnim i crvenim vinima, odgovorni su za boju vina i uglavnom ih nema u bijelim vinima.

Flavonoidi sve više postaju predmet medicinskih istraživanja. Izviješteno je da posjeduju brojna korisna svojstva, uključujući i protuupalno djelovanje, proestrogeni učinak, inhibiciju enzima, antimikrobno djelovanje, antialergijsku aktivnost, antioksidativnu i vaskularnu aktivnost i citotoksičnu antitumorsku aktivnost (30).

1.3.2. Ne-flavonoidi

Osnovni ne-flavonoidi su fenolne kiseline i stilbeni.

Fenolne kiseline su aromatski sekundarni biljni metaboliti, široko rasprostranjeni u cijelom biljnom kraljevstvu.

Fenolne kiseline su jaki antioksidansi s jedne strane, ali s druge strane mogu uzrokovati tamnjenje mošta i vina što za posljedicu degradira kvalitetu vina. Iako njihova koncentracija u crvenom i bijelom vinu se ne razlikuje puno, oni su najbrojnija skupina fenolnih spojeva u bijelom vinu, dok su u crnom vinu treća najveća skupina nakon antocijanina i kondenziranih tanina (31).

Stilbeni su proizvod vinove loze kao obrambeni odgovor na infekcije različitim mikroorganizmima, UV zračenje i druge oblike stresa (32). Resveratrol se u grožđu nalazi primarno u kožici. Količina resveratrola se razlikuje u različitih sorti grožđa, ovisi o geografskom podrijetlu i izloženosti stresu iz okoliša. Sadržaj resveratrola u vinu ovisi i o duljini fermentacijskog vremena.

1.4. Vinifikacijski procesi

1.4.1. Fermentacija

Fermentacija je metabolički proces koji pretvara šećer u alkohol i plinove ili kiseline. To se događa u stanicama primitivnih organizama (kvasci i bakterije), ali i u viših organizama, primjerice u mišićnim stanicama sisavaca tijekom anaerobnogh metabolizma dolazi do nastanka mliječne kiseline. Francuski mikrobiolog Louis Pasteur često se pamti zbog svojih spoznaja o fermentaciji i njezinim mikrobnim uzrocima. Znanost o fermentaciji poznata je kao zimologija.

Fermentacija se odvija kada lanac elektronskog transporta postane neupotrebljiv (često zbog nedostatka konačnog elektron akceptora, kao što je kisik). U tom slučaju fermentacija postaje primaran put proizvodnje ATP-a (energije). Fermentacijom se NADH i piruvat, proizvedeni u glikolizi, pretvaraju u NAD^+ i organsku molekulu (koja varira ovisno o vrsti fermentacije). U nazočnosti kisika, NADH i piruvat se koriste za stvaranje ATP-a kod disanja. To se naziva oksidativna fosforilacija, a generira mnogo više ATP-a nego sama glikoliza. Iz

tog razloga, stanice općenito imaju koristi od izbjegavanja fermentacije u prisutnosti kisika, osim kod obligatnih anaeroba koji kisik ne toleriraju.

Ljudi su koristili fermentaciju za proizvodnju pića i napitaka još od neolita. Na primjer, fermentacija se koristi za konzerviranje u procesu koji proizvodi mliječnu kiselinu, a koja se nalazi u kiseloj hrani kao što su jogurt i ukiseljeni krastavci, kao i za proizvodnju alkoholnih pića kao što je vino i pivo (33).

Kemijska jednadžba u nastavku sažima fermentaciju saharoze ($C_{12}H_{22}O_{11}$) u etanol (C_2H_5OH). Alkoholna fermentacija pretvara jedan mol glukoze u dva mola etanola i dva mola ugljičnog dioksida, pri čemu nastaju dva mola ATP.

Konačna kemijska formula za alkoholnu fermentaciju je:

$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2\ C_2H_5OH + 2\ CO_2$ (34)

1.4.2. Maceracija vina

U proizvodnji bijelih vina, maceracija se izbjegava ili dopušta samo u vrlo ograničenom obliku na način da sok kratkotrajno dodiruje pokožicu grožđa tijekom tiještenja.

Postupak maceracije započinje, u različitoj mjeri, čim se kožica grožđa razbije i izloži nekom stupnju topline. O temperaturi sve ovisi: što je veća temperatura, veći je i stupanj ekstrakcije fenola iz kožice i drugih dijelova grožđa. Maceracija se nastavlja i tijekom fermentacijskog razdoblja, a može trajati i kada kvasac pretvori sve šećere u alkohol. Sam proces je spor sa spojevima kao što su antocijanini koji trebaju proći kroz staničnu membranu kože da bi došli u dodir s vinom. Tijekom fermentacije, s višim temperaturama i višim razinama alkohola može se potaknuti taj proces s alkoholom koji djeluje kao otapalo, koje pomaže u raspadanju organskih spojeva unutar grožđa. Čini se da taj proces usporava nakon što vino dostigne razinu alkohola od 10%.

Ovisno o sorti, proces maceracije može pomoći u poboljšanju okusa u vinu, koja inače nedostaju. Osim što utječe na okus, može intenzivirati i boju vina. Veća ekstrakcija može povećati složenost i očekivano trajanje vina razvijanjem složenijih tanina koji će se ublažiti tijekom duljeg vremenskog razdoblja.

Prilikom proizvodnje bijelih vina, maceracija se u pravilu pokušava izbjeći ili svesti na minimum. Ipak, u Hrvatskoj je u zadnje vrijeme oživjela tradicija proizvodnje maceriranih bijelih vina, poznatih i pod nazivom narančasta ili jantarna vina. Tehnologija maceracije bijelog grožđa stara je nekoliko tisuća godina, a potječe iz Gruzije, gdje se dugotrajna

maceracija provodila u velikim zemljanim amforama, tzv kvevri. Kvevri su se izolirale pčelinjim voskom i najčešće bile ukopane u tlu ili ugrađene u podove vinskih podruma, a u njima se vršila fermentacija grožđanoga soka s biljnim materijalom uključujući često i peteljke. Nakon fermentacije amfora se hermetički zatvarala hrastovim poklopcem i glinom. Nakon 5-6 mjeseci vršila se filtracija, a vino se vraćalo natrag u amfore ili velike drvene bačve, na dugo dozrijevanje (do 2 godine) uz povremeno miješanje. U Gruziji se i danas proizvodi macerirano bijelo vino, pri čemu se vino stabilizira i zrije u amforama (ili drvenim bačvama) oko 4 godine, uz redovno pretakanje i čuvanje bez doticaja sa zrakom (35). 90-ih godina prošlog stoljeća proizvodnju jantarnih vina sličnom tehnologijom potaknuli su talijanski proizvođači iz regije Friuli Venezia Giulia. Proizvodnja se iz Italije proširila i na susjedne regije u Sloveniji, Hrvatskoj, a postoji i u Francuskoj, Njemačkoj, Novom Zelandu i Kaliforniji (36).

Tehnološki postupak produljene maceracije značajno mijenja organoleptička svojstva i biokemijski sastav bijeloga vina. Sadržaj ukupnih fenola u ovim je vinima višestruko veći u odnosu na „obična“ bijela vina. Zbog brojnosti fenolnih spojeva veća je vjerojatnost njihovih međusobnih interakcija, kondenzacije i eventualnog taloženja. Oksidacija je u ovim vinima također intenzivnija, obzirom da se često proizvode bez dodavanja konzervansa Biološki učinci maceriranih bijelih vina prema našim saznanjima do sada nisu istraživani.

1.4.3. Oksidacija vina

Oksidacija je kemijski proces kojim se elektron uklanja iz atoma, ili skupine atoma, kroz reakcije koje mogu ili ne moraju uključivati gubitak kisika ili vodika. Uz neke iznimke, učinci oksidacije u hrani smatraju se štetnim i mogu uključivati degradaciju vitamina ili lipida, gubitak vrijednosti hranjivih tvari, razvoj neugodnog okusa i posmeđivanje.

Nakon otvaranja boce i doticaja sa zrakom vino je podložno oksidacijskim reakcijama. Niz je organskih tvari u vinu koje su potencijalna meta oksidacijskih procesa, od etanola, preko kiselina, naročito vinske kiseline, do polifenola. Zanimljivo je da su spojevi iz skupine alkohola i kiselina inače značajno otporni na oksidaciju, osim ako je ona združena s oksidacijom polifenola (37)(38).

Ukratko, vinski fenoli koji sadrže 1,2-difenolnu (orto-katehol grupu) oksidacijom se pretvaraju u u kinone (Slika 8) i to posebice u lužnatom mediju (39). Nastali kinoni podložni su daljnjim reakcijama s preostalim polifenolima koje dovode do smeđeg obojenja

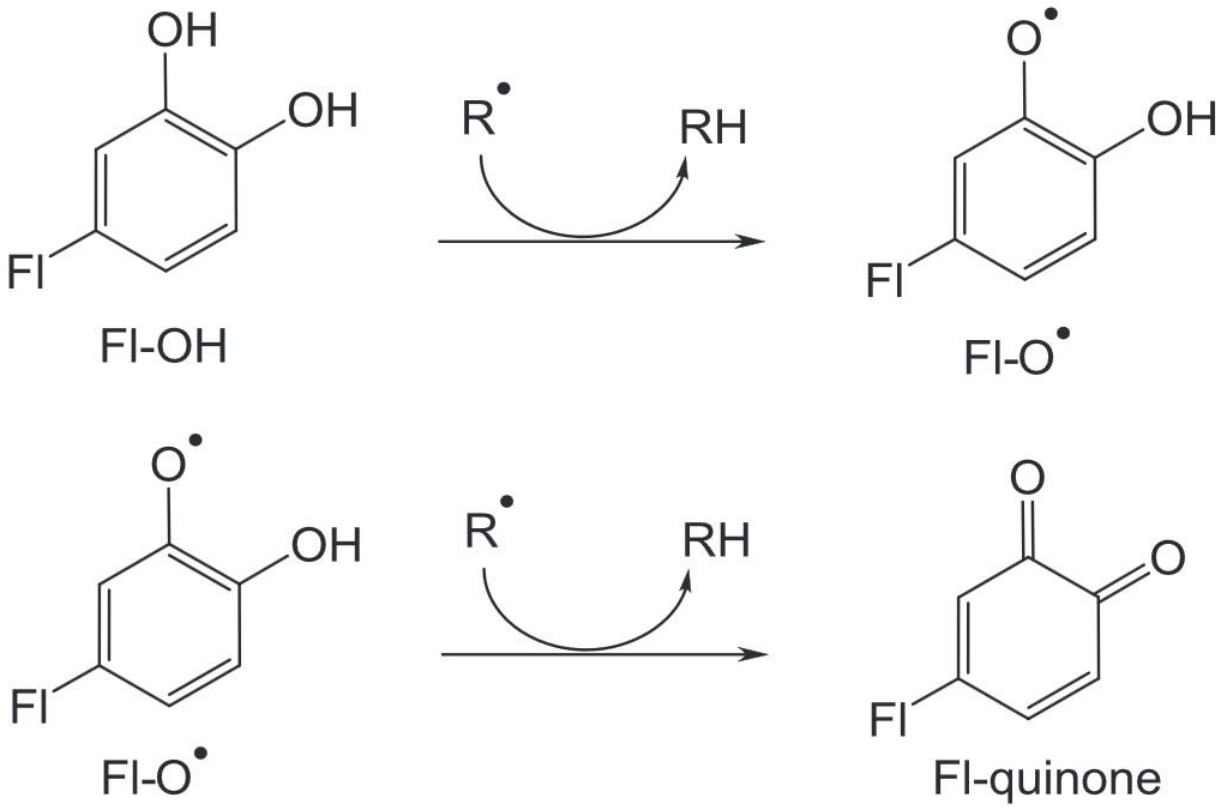
oksidiranog vina. Na taj način regenerira se mala količina početnih dikatehola koja je ponovno podložna oksidaciji.

Kao što je već rečeno, u uvjetima visokog pH, fenolni spojevi mogu izravno reagirati s kisikom. Slabo kiseli karakter fenolnih spojeva (pKa od 9 do 10) omogućava im formiranje fenolnih aniona koji mogu reagirati s kisikom. Uklanjanje jednog elektrona iz fenolnog aniona rezultira semikinonom. Pri umjereno visokom pH (pH od 7 do 9), fenolima se s pirogalolnim jedinicama (kao što je (-)-epigalokatehin) lakše oksidirati od onih s jednostavnim kateholnim supstituentima. Pri pH>10, supstituenti na prstenu C mogu se oksidirati, uravnotežujući reaktivnost fenola s bilo kojim katehol ili pirogalolnim jedinicama. Međutim, s obzirom da su vina kisela, a fenoli imaju visok pKa, samo će mali dio vinskih fenola biti deprotoniran tako da se sve ove potencijalne reakcije ne događaju često.

Reakcije oksidacije najčešće su katalizirane ionima željeza i bakra u tzv. Fentonovoj reakciji koja pretvara vodikov peroksid u potentni hidroksilni radikal odgovoran za oksidaciju organskih spojeva (40).

Kada fenoli reagiraju s hidroperoksilnim radikalom, reakcijska brzina svakog fenola ovisi o njegovoj sposobnosti stvaranja stabilnog radikalnog produkta. Spojevi koji sadrže 1,2,3-trihidroksilnu skupinu (pirogalol) ili 1,2-dihidroksi aromatski prsten (katehol) se najlakše oksidiraju jer produkt oksidacije, fenoksilni semikinonski radikal može biti stabiliziran s drugim atomom kisika. Primjeri vinskih fenola koji imaju ove funkcionalne skupine uključuju kafeinsku kiselinu, katehin, epikatehin, epikatehin galat, galnu kiselinu, proantocijanidine, hidrolizirane tanine i kvercetin. Ukratko, skoro svi fenoli vina su vrlo reaktivni prema hidroperoksilnom radikalu. Monofenoli i njihov ekvivalent meta-di-fenol i supstituirani fenoli (naročito metoksi derivati) slabije su podložni oksidaciji jer ne proizvode stabilizirani semikinon radikal.

Oksidacijske reakcije mogu promijeniti kemijski i osjetilni profil vina, a kakve posljedice oksidacija ima na biološke učinke vina zasada je u cijelosti neistraženo.



Slika 8 Oksidacija flavonoida u semikinone i kinone (41)

1.5. Antimikrobni učinci vina

Jedan od važnih bioloških učinaka vina je i snažna antimikrobna aktivnost,koja je pokazana u *in vivo* (42) i *in vitro* studijama (43)(44) i to, kako za intaktno vino, tako i za pojedine sastojke vina (45).

Rodriguez-Vaquero i suradnici pokazali su da vino inhibira rast *Escherichie coli,* ovisno o ukupnom polifenolnom sadržaju. Ekstrakti crvenog i bijelog vina bez alkohola pokazali su antimikrobnu aktivnost na neke patogene kao što su *Staphylococcus aureus, Escherichia coli i Candida albicans*. Rezultati sugeriraju da su polifenolni spojevi sadržani u vinima odgovorni za antimikrobne učinke (46).

Antimikrobna aktivnost fermentirane komine bilo je jednako djelotvorna ili značajno bolja od cjelovitog ekstrakta voćnog grožđa. Neka su istraživanja pokazala da su ekstrakti sjemenki učinkovitije antimikrobni od ostalih dijelova grožđa. Prema porastu antimikrobne

aktivnosti je meso, cijeli ekstrakt voćnih vina, fermentirana komina, koža, listovi i sjemenke (39).

Neki istraživači su izvijestili o sinergiji između flavonoida i drugih antibakterijskih sredstava protiv rezistentnih sojeva bakterija.

Ukazuju da različiti spojevi unutar ove klase fitokemikalija mogu ciljati različite komponente i funkcije bakterijske stanice.

Nekoliko istraživačkih grupa je pokušalo utvrditi da li je flavonoidna aktivnost bakteriostatička ili baktericidna provodeći „time to kill“ studije u kojima se mjeri vrijeme potrebno za potpunu inhibiciju bakterijske kulture (4).

1.6. Uzročnici hranom prenosivih infekcija

Hranom prenosive infekcije nastaju kao posljedica trovanja hranom uzrokovana enterotoksinima bakterija. Najčešće su to *Staphylococcus aureus* i *Clostridium perfingens*. Toksin stafilokoka, kao i spore klostridija, jako su otporne na temperaturu, pa ih ne uništava ni kraće grijanje niti kuhanje hrane. Stafilokoki obično obitavaju u respiratornom traktu, a klostridiji u svježem i smrznutom mesu. Epidemije su češće ljeti i javljaju se nakon kratke inkubacije. Stafilokokne intoksikacije počinju naglo, mučninom i povraćanjem, općom slabošću, ponekad popraćene proljevima; temperatura obično nije povišena, ali mogu biti izraženi simptomi dehidracije. Kod intoksikacija klostridijima bolest počinje nakon nešto duže inkubacije, bolovima u trbuhu i proljevom bez povraćanja. Uzročnici se obično u stolici ne mogu dokazati, već u ostacima konzumirane hrane (47).

1.6.1. *Escherichia Coli*

Escherichia coli je gram-negativna, fakultativno anaerobna, štapićasta, koliformna bakterija roda *Escherichia*, koja se obično nalazi u crijevima toplokrvnih organizama (48)(49).

Bakterija *Escherichia coli (E. coli)* normalni je stanovnik ljudskog probavnog sustava, ali također i jedna od najučestalijih uzročnika infekcija. Premda najčešće dovodi do infekcija mokraćnog i probavnog sustava, može uzrokovati i upalu žuči, upalu pluća, meningitis kod novorođenčadi, kao i teške oblike sepse. Ovaj mikroorganizam prvi je opisao znanstvenik Theodor Escherich 1885. godine kad ga je izolirao iz stolice novorođenčadi, a kompletni

genom je sekvencioniran 1997. godine. Mikrobiološki se radi o gram-negativnoj štapićastoj bakteriji koja može biti odvojena ili u paru, a kretanje joj omogućuje specifična rotacija trepetiljki. Metabolizam joj je fakultativno anaeroban, što znači da može rasti bez kisika, ali ga može iskoristiti ako je prisutan.

Najčešće sijelo infekcija bakterijom *E. Coli* jest mokraćni sustav. Do infekcije dovode tzv. uropatogeni sojevi *E. coli* koji imaju sposobnost vezanja za stanice mokraćnog trakta, pokazuju otpornost na imunološku reakciju domaćina, a imaju i druge čimbenike virulencije kao što su siderofore i citotoksini. Važan faktor su i tri različita tipa fimbrija (najčešće P fimbrije, ali i fimbrije tipa 1 te S fimbrije) kojima se u početku infekcije vežu za epitelne stanice mokraćnog sustava. Infekcijama donjeg mokraćnog sustava su sklonije žene jer imaju kratku mokraćnu cijev koja se nalazi u blizini završnog dijela debelog crijeva.

E. coli raste dobro na hranjivim podlogama koje se koriste u rutinskom laboratorijskom radu, a bojanjem po Gramu moguće je uočiti specifičnu morfologiju uzročnika (50).

Bakterija se može uzgajati i uzgajati lako i jeftino u laboratorijskoj sredini i intenzivno se istražuje već više od 60 godina. *E. coli* je kemoheterotrof, čiji kemijski definirani medij mora sadržavati izvor ugljika i energije (51). Optimalni rast *E. coli* događa se na 37 °C, ali neki laboratorijski sojevi mogu se množiti na temperaturama do 49 °C (52). *E. coli* raste u različitim definiranim laboratorijskim medijima, kao što je lizogeni bujon, ili bilo koji medij koji sadrži glukozu, amonijev fosfat, monobazni, natrijev klorid, magnezijev sulfat, kalijev fosfat dvobazni i vodu. Rast može biti potaknut aerobnim ili anaerobnim disanjem pomoću velikog broja redoks parova, uključujući oksidaciju piruvinske kiseline, mravlje kiseline, vodika i aminokiselina, te redukciju supstrata kao što su kisik, nitrat, fumarat, dimetil sulfoksid i trimetilamin N-oksid (53).

U ovom pokusu je korištena *E. coli* serotipa O6, biotipa 1. Uzgaja se na hranjivom mediju na temperaturi od 37 ^{0} C u aerobnim uvjetima. Ispitana je i dokazana osjetljivost ovog soja bakterija na antibiotike: cefaleksin, cefaloglicin, kanamicin, cefaloridin, cefalomicin, cefalotin, kloramfenikol, kolistin, kolimicin, gentamicin, nalidiksinska kiselina, neomicin i tetraciklin. Za ispitivanje antibiotske osjetljivosti koristile su se validirane metode (54).



Slika 7 *E. Coli* na krvnom agru.

1.6.2. *Salmonella Enterica*

Salmonella je rod gram-negativnih štapićastih bakterija obitelji *Enterobacteriaceae*. Dvije vrste su *Salmonella enterica* i *Salmonella bongori* (55).

S. enterica podvrsta se nalazi u svim toplokrvnim životinjama i okolišu. *S. bongori* je ograničena na hladnokrvne životinje, osobito gmazove (51).

Bakterije se ne mogu uništiti zamrzavanjem (56)(57), ali UV svjetlo i toplina ubrzavaju njihovo uništenje.

Većina podvrsta proizvodi vodikov sulfid, koji se lako može otkriti uzgojem na mediju koji sadrži željezni sulfat (58). *Salmonella* se također može detektirati upotrebom *multiplex* (59) ili lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (PCR) (60) iz ekstrahirane DNA.

Salmonella Typhi strogo je ljudski patogen, uzrokujući invazivnu crijevnu groznicu, dok većina drugih serotipova salmonele uzrokuje uglavnom gastrointestinalne sindrome bez invazije na krvotok. Kako se naša iskustva s različitim serotipovima *Salmonella* povećavaju, saznajemo više o njihovim različitim rezervoarima i epidemiologiji. Takav je slučaj sa

Salmonellom entericom, serotip *Enteritidis* (SE). U ovom trenutku SE je postala prvi ili drugi najčešći serotip Salmonele u mnogim zemljama.

Ključan čimbenik koji omogućuje da jaje postane učinkovito sredstvo za ljudsku infekciju je način na koji ljudi drže i jedu jaja. Jaja su jedan od rijetkih proizvoda životinjskog podrijetla koji se često jedu sirovi ili nedovoljno kuhani. Stupanj u kojemu su jaja nedovoljno kuhana je izravno povezan s bolesti (61).

U ovom pokusu je korištena *S. enterica* serotipa *Enteritidis* s antigenom I1,9,12:g,m:-, koji je član udruženih antigena za imunizaciju stoke u proizvodnji lijeka za reumatoidni artritis. Ova vrsta raste na temperaturi od 37 ^{0} C u aerobnim uvjetima (62).



Slika 8 *S. enterica* na krvnom agru

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Prvi cilj ovog istraživanja bio je utvrditi dolazi li do promjene antimikrobnog učinka maceriranog bijelog vina Graševine nakon spontane oksidacije tijekom 48 sati.

Drugi cilj bio je ispitati utječe li spontana 48-satna oksidacija maceriranog bijelog vina Graševine na njegov biokemijski sastav i antioksidacijski učinak in vitro.

Treći cilj bio je usporediti promjene antimikrobnog i antioksidacijskog učinka oksidiranog vina te ih povezati s biokemijskim sastavom vina.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Priprema uzoraka vina

Za potrebe provedenog istraživanja korišteno je macerirano bijelo vino Graševina, Kuvlakhe vinarije Krauthaker, Kutjevo, berba 2015. godine. Vino je proizvedeno postupkom spontanog vrenja grožđanog soka u dodiru s čvrstim djelovima grožđa. Nakon toga su se tankovi vina, bez uklanjanja sjemenki i pokožica grožđa te dodavanja vinskih konzervansa, hermetički zatvorili omogućujući vinu daljnje sazrijevanje pri konstantnoj temperaturi tijekom 120 dana.



Slika 9 Intaktno macerirano bijelo vino Graševina Kuvlakhe u originalnoj boci.-

Prilikom izvođenja eksperimenata originalna butelja bi se otvorila i vino prelilo u bočice volumena 100 ml koje su se čuvale u hladnjaku (pri 4°C).

U pripremi uzorka oksidiranog vina, bočica maceriranog vina bi se izvadila iz hladnjaka, vino prelilo u laboratorijsku čašicu (volumena 50 mL), a oksidacija bi se postigla izlaganjem zraku tijekom 48 sati. Uzorci maceriranog vina nisu se pohranjivali već su se neposredno koristili za pokuse.

Za svaki mikrobiološki pokus korišten je jedan netom pripremljeni uzorak oksidiranog maceriranog vina.



Slika 10 Usporedba oksidiranog i intaktnog maceriranog bijelog vina u Laboratoriju za eksperimentalnu farmakologiju Zavoda za temeljnu i kliničku farmakologiju.

3.2. Biokemijska analiza testnih uzoraka

3.2.1. Standardna enološka analiza vina

Intaktna macerirana Graševina analizirana je u Enološkom laboratoriju Zavoda za jadranske kulture i melioraciju krša. Određen je niz fizikalno-kemijskih parametara uključujući sadržaj alkohola, ph vrijednost, kiselost te koncentraciju sumporovog dioksida.

3.2.2. Analiza fenolnih spojeva

Ukupan sadržaj fenola u uzorcima je određen Folin-Ciocalteau kolorimetrijskom metodom i rezultati su izraženi kao ekvivalent galne kiseline po litri (GAE, engl gallic acid equivalent). Sadržaj katehina koji uključuje flavanolne monomere i oligomerne procijanidine određen je metodom s vanilinom, a ukupnih flavanol-monomera metodom s p-dimetilaminocinamaldehidom (p-DMACA). Kao standardi korišteni su (+)-katehin i epikatehin. Flavonoidni i neflavonoidni sadržaj je određen Folin-Ciocalteau metodom nakon taloženja flavonoida s formaldehidom. Sva mjerenja su provedena spektrofotometrijski. Apsorpcija je praćena UV-VIS spektrofotometrom (Specord 200, Analytik Jena Inc., Jena, Germany), opremljen sa držačem za 6 kiveta i termostatski kontroliranom kupelji. Detaljnija objašnjenja navedenih metoda su već prije objavljena (63).

3.2.3. Antioksidativni kapacitet

Ukupni antioksidativni kapacitet uzoraka je određen korištenjem FRAP (antioksidativna snaga reducirajućeg željeza) metode (Benzie i Strain 1996).

U ovoj metodi, antioksidansi su procijenjeni kao reducensi Fe^{3+} u Fe^{2+}, koji je keliran s 2,4,6-tripiridil-s-triazinom (TPTZ) i tvori Fe^{2+}-TPTZ kompleks koji je plavo obojen i čija je apsorpcija na 593 nm.

$$Fe3+ - TPTZ \longrightarrow Fe2+ - TPTZ$$

Mjerenja su provedena u tri ponavljanja. Rezultati su uspoređeni sa standardnom krivuljom pripremljenom s različitim koncentracijama Troloxa, u vodi topljivog analoga vitamina E, te su izražena kao ekvivalent mikromolarnog Troloxa (TE).

Postupak mjerenja: u kivetu spektrofotometra doda se 2250 µl FRAP reagensa koji se priprema miješanjem 1) 300 mmol/l acetatnog pufera pH 3,6, 2) 10 mmol/l TPTZ otopljenog u 40 mmol/l HCl i 3) 20 mmol/l FeCl3 x 6 H2O; u omjeru 10:1:1 te izmjeri apsorbancija kod 593 nm. Nakon toga se u kivetu doda 75 µl ispitivanog vina (razrijeđenog u omjeru 1:10 s H2O) i 225 µl H2O. Nakon 4 minute latencije, opet se izmjeri apsorbancija kod 593 nm. Dobivene vrijednosti (razlike između apsorbancija u 4. i nultoj minuti) izražavaju se u ekvivalentima troloksa (sintetskog i vodotopljivog analoga vitamina E). Kalibracijski pravac troloksa (koncentracija prema apsorbanciji) svakodnevno se izrađuje primjenom troloksa (koncentracije 0, 250, 500, 1000 i 2000 µmol/l). Antioksidacijski kapacitet fenolnih kiselina

je, osim FRAP metodom, određen i primjenom TEAC (engl. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) metode. TEAC se temelji na sposobnosti uzorka (antioksidansa) da reducira radikal kation 2,2'-azinodi (3- etilbenzotiazolin)-6-sulfonat ($ABTS^{\cdot+}$), koji je plavo-zelene boje. TEAC metoda mjeri promjene apsorbancije kod 734 nm zbog nastajanja bezbojnog produkta. Mjerenja su vršena u triplikatu, a rezultati izraţavani kao milimolarni ekvivalenti Troloksa (TE).

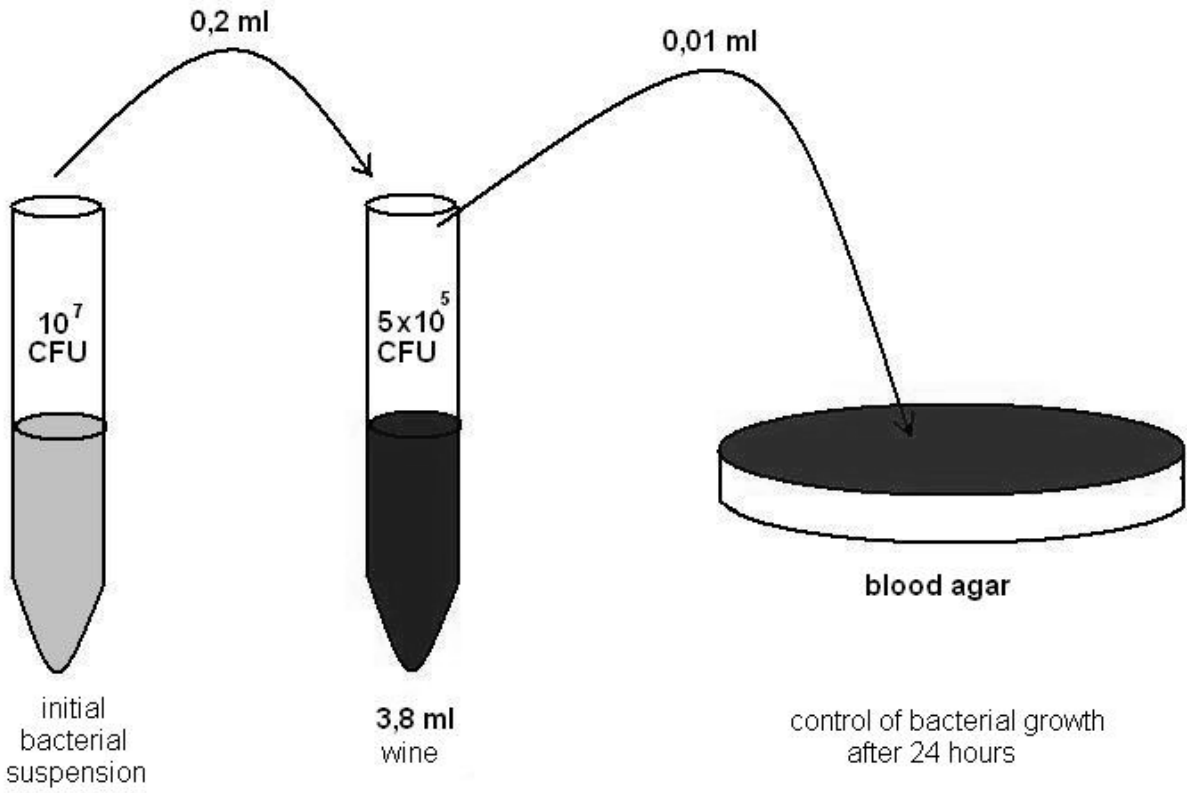
3.2.4. Reagensi i kemikalije

Sve kemikalije i reagensi su analitičke kvalitete i nabavljeni su od Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., U.S.A.), Aldrich Chemical Co. (Steineheim, Germany), i Merck (Darmstadt, Germany). Deionizirana (Mill Q) voda je korištena u pripremi svih otapala i reagensa.

3.3. Mikrobiološka analiza

Ispitivani organizmi su uključivali *Escherichiu coli,* American Type Culture Collection (ATCC) 25922 i *Salmonella enterica* podvrste Enteritidis, ATCC 13076.

Bakterije koje su porasle na krvnom agaru s 5% ovčje krvi nakon prekonoćne inkubacije na 35 °C (Bio-Rad, Hempstead, Velika Britanija), suspendirane su se u suspenzijskom mediju (bioMerieux, Marcy l'Etoile, Francuska) tako da se postigne gustoća od 10^7 koloniformnih jedinica (colony forming units -CFU)/ml (turbiditet od 0,5 McFarland opacitetnog standarda). Turbiditet suspenzije se određuje korištenjem Denzomata (bioMerieux, Marcy l'Etoile, Francuska). Volumen od 200 µL bakterijske suspenzije se zatim doda u 3,8 ml svakog od ispitanih uzoraka vina i u isti volumen sterilne fiziološke otopine (kontrola) čime se dobije početna koncentracija od 10^5 do 10^6 CFU/ml. Kontrola bakterijskog rasta je uključena u svaki pokus. Suspenzija se zatim izmiješa u vortex miješalici i u utvrđenim vremenskim razmacima, u duplikatu inokulirala kalibriranom ezom (0,01 ml) na krvni agar. Ploče se zatim inkubiraju 24 sata na temperaturi od 35 °C. Bakterijski rast se određuje kao broj kolonija koje se vide prostim okom, a rezultati duplikata ploča su srednje vrijednosti. Odsutnost vidljivog rasta bakterija na pločama predstavlja donju granicu detekcije. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost iz najmanje tri nezavisna pokusa za svaku vremensku točku, za svaki ispitani uzorak (15).



Slika 11 Shema mikrobiološkog postupka

3.4.Statistička analiza

Podaci su analizirani korištenjem GraphPad InStat verzije 3.06 za Windows, GraphPad Software, San Diego, Calif., U.S.A. Statistička analiza je napravljena jednosmjernom analizom varijanci pomoću Tukey testa. Podaci su izraženi kao srednje vrijednosti ± standardne greške srednje vrijednosti (SEM). $P < 0.05$ se smatra statistički značajnom.

Podaci su analizirani korištenjem GraphPad InStat verzije 3.06 za operativni sustav Windows, GraphPad Software, San Diego, Kalifornija, SAD.za operativni sustav Windows, GraphPad Software, San Diego, Kalifornija, SAD. Rezultati su prikazani primjenom programa GraphPad Prism verzije 4.03 (5).

Podaci biokemijskih analiza izraženi su kao srednja vrijednosti ± standardna pogreška sredine (SEM) ili standardna devijacija (SD). Statistička značajnost razlike između dobivenih rezultata provjerena je Mann-Whitney U testom. Vrijednost $p < 0,05$ predstavlja granicu statističke značajnosti.

Statistička analiza distribucije podataka provjerena je Kolmogorov-Smirnovljevim testom.

Statistička analiza standardnih devijacija provjerena je Bartlettovim testom.

Podaci mikrobioloških analiza prikazani su grafički. Statistička značajnost razlike između skupina provjerena je neparametrijskom inačicom jednosmjerne analize varijance (ANOVA), Kruskal-Walisovim H testom, s post-hoc Dunnovim testom. Rezultati su prikazani kao razlike rangova prosjeka pojedinih skupina. Vrijednost $p < 0,05$ predstavlja granicu statističke značajnosti.

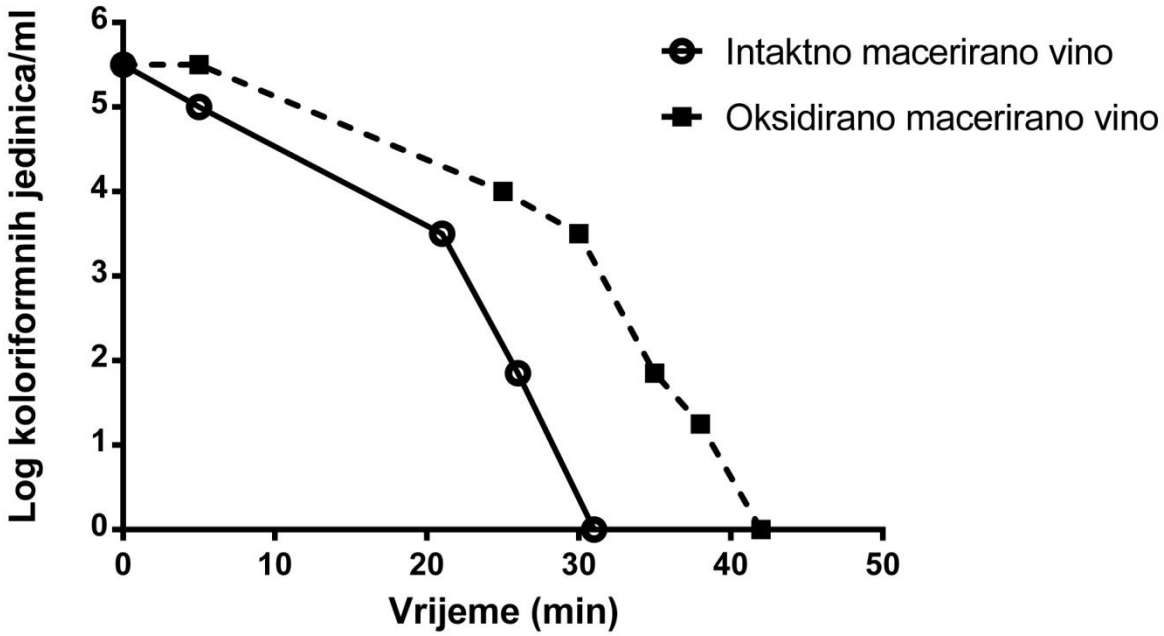
4. REZULTATI

4.1. Antibakterijska aktivnost

Oba su ispitivana uzorka vina ostvarila antibakterijski učinak.

Očekivano, intaktno je macerirano vino pokazalo superiorniju antibakterijsku aktivnost u odnosu na oksidirano macerirano vino na obje bakterijske vrste.

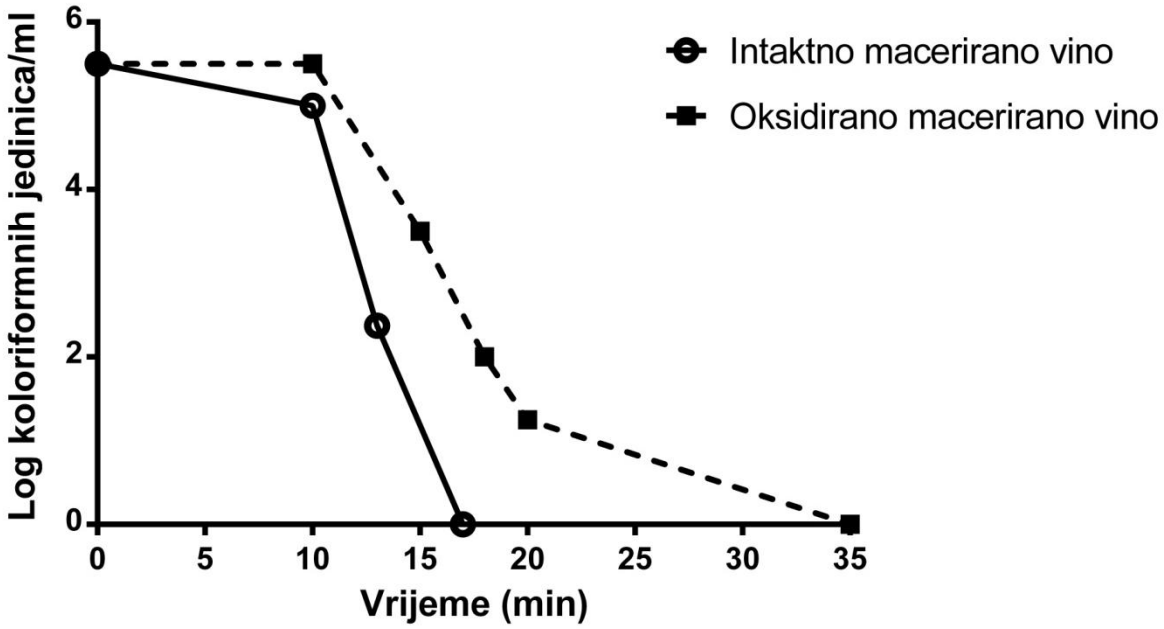
4.1.1. *Escherichia coli*



Slika 12 Antibakterijska učinkovitost prema E.coli ovisna o vremenu inkubacije s intaktnim i maceriranim vinom. Početne koncentracije od 10^5 do 10^6 CFU/ml u fiziološkoj otopini korištene su za kontrolu rasta bakterija (krivulja nije prikazana). Podaci predstavljaju prosjek iz najmanje tri nezavisna pokusa.

Intaktno macerirano bijelo vino je u vremenu od 31 minute pokazalo antibakterijski učinak. Oksidacija je produljila vrijeme potrebno za inhibiciju bakterijskog rasta za oko 30% tako da je oksidirano vino pokazalo antibakterijski učinak u vremenu od 42 minute (Slika 15).

4.1.2. *Salmonella enteritidis*



Slika 13 Antibakterijska učinkovitost prema S.*enterica* ovisna o vremenu inkubacije s intaktnim i maceriranim vinom. Početne koncentracije od 10^5 do 10^6 CFU/ml u fiziološkoj otopini korištene su za kontrolu rasta bakterija (krivulja nije prikazana). Podaci predstavljaju prosjek iz najmanje tri nezavisna pokusa.

Salmonella se pokazala osjetljivijom na djelovanje maceriranog vina. Antibakterijski učinak ostvaren je u 17. minuti. Međutim, oksidirano macerirano vino ostvarilo je svoj antibakterijski učinak u više nego dvostruko duljem vremenu, u 35. minuti (Slika 16).

4.2. Biokemijska analiza vina

Tablica 1. Enološki fizikalno-kemijski parametri intaktnog maceriranog vina Graševine

Mjereni parametri	Intaktno macerirano vino
Relativna gustoća	0,9935 ± 0,0003
Ukupni alkohol (vol %)	13,40 ± 0,25
Stvarni alkohol (vol %)	13,30 ± 0,30
Stvarni alkohol (g/L)	105,00 ± 1,34
Ukupni suhi ekstrakt (g/L)	27,60 ± 1,45
Reducirajući šećeri (g/L)	3,70 ± 0,94
Ekstrakt bez šećera (g/L)	24,90 ± 1,48
Ekstrakt bez šećera i nehlapljiive kiselosti (g/L)	21,00 ± 1,45
Pepeo (g/L)	3,60 ± 0,36
pH-vrijednost	3,94 ± 0,12
Ukupna kiselost (izražena kao vinska) (g/L)	4,80 ± 0,40
Hlapljiva kiselost (izražena kao octena) (g/L)	0,70 ± 0,12
Nehlapljiva kiselost (izražena kao vinska) (g/L)	4,00 ± 0,20
Slobodni SO_2 (mg/L)	1 ± 0,7
Ukupni SO_2 (mg/L)	3 ± 1,3

Podaci su dobiveni iz najmanje dva nezavisna uzorka i prikazani su kao srednja vrijednost ± SEM.

Enološka analiza potvrđuje da je macerirana Graševina vino s vrlo niskim koncentracijama slobodnog i ukupnog SO_2, te je stoga lako podložna spontanoj oksidaciji u doticaju sa zrakom.

Spontana oksidacija značajno je promijenila sadržaj ukupnih fenola, te pojedinih fenolnih skupina. Sadržaj ukupnih fenola (3310,0 ± 45,8 mg/L *versus* 3653,3 ± 23,1 mg/L, za intakno i oksidirano vino) i flavonoida (2985,8 mg/L *versus* 3345 mg/L) veći je nakon oksidacije. Detaljnijom analizom flavanolske podskupine flavonoida pokazano je da oksidacija povećava sadržaj ukupnih flavanola (2771,3 ± 115,6 mg/L *versus* 3317,6 ± 178,6

mg/L), a smanjuje sadržaj monomernih spojeva (649,6 ± 13,5 mg/L *versus* 616,7 ± 27,0 mg/L). Nadalje, sadržaj ne-flavonoida također je niži u oksidiranom vinu (324,2 ± 1,4 mg/L versus 308,3 ± 2,9 mg/L).

Sukladno razlikama u koncentraciji ukupnih fenola očekivana je i razlika u antioksidacijskom kapacitetu ispitivanih vina. Uzorak je intaktnog maceriranog vina ostvario nešto slabiji antioksidacijski učinak. U oksidiranom vinu antioksidacijski potencijal iznosio je 12,592 ± 0,0784 mmol TE/L, dok je u intaktnom bijelom vinu iznosio 10,415 ± 0,0494 mmol TE/L.

Tablica 2. Polifenolni sadržaj i sastav te antioksidacijski kapacitet (FRAP) intaktnog i oksidiranog maceriranog vina Graševine

Uzorci	Intaktno macerirano vino	Oksidirano macerirano vino
Ukupni fenoli (mg GAE/L)	3310,0 ± 45,8*	3653,3 ± 23,1*
Neflavonoidi (mg GAE/L)	324,2 ± 1,4*	308,3 ± 2,9*
Flavonoidi (mg GAE/L)	2985,8*	3345*
Flavanol monomeri i procijanidini – Vanilin metoda (mg CE/L)	2771,3 ± 115,6*	3317,6 ± 178,6*
Flavanol monomeri – DMACA metoda (mg ECE/L)	649,6 ± 13,5*	616,7 ± 27,0*
FRAP (Trolox eq.)	10,415 ± 0,0494*	12,592 ± 0,0784*

GAE (eng. Gallic acid equivalent) – ekvivalent galne kiseline; CE (eng. Catechin equivalent) – ekvivalent katehina; DMACA (eng. p-Dimethylaminocinnamaldehyde); ECE (eng. Epicatechin equivalent) – ekvivalent epikatehina; FRAP (eng. Ferric reducing antioxidant capacity). Podaci su dobiveni iz najmanje dva nezavisna uzorka i prikazani su kao srednja vrijednost ± SEM. *$p < 0,05$

5. RASPRAVA

U ovom smo istraživanju proučavali utjecaj oksidacije vina na antimikrobni učinak protiv *E. Coli* i *S. Enteritidis*, bakterija koje predstavljaju uzročnike alimentarnih infekcija. Ispitivanje je pokazalo značajnu razliku u inhibicijskom djelovanju intaktne i oksidirane macerirane Graševine. Učinak oksidirane macerirane Graševine je u svakom pokusu bio slabiji od učinka intaktne Graševine, što se očitovalo kao duže vrijeme potrebno za izostanak porasta bakterija na hranjivoj podlozi. Pretraživanjem literature nije pronađeno niti jedno istraživanje koje je ispitivalo biološki učinak oksidiranog bijelog vina.

Iako su antimikrobni učinci vina već istraživani, točni mehanizmi odgovorni za antimikrobni učinak vina nisu u potpunosti razjašnjeno i pripisuju se različitim komponentama vina (61).

Mnogi istraživači su pokušali otkriti koji su fenolni spojevi i kemijske strukture u najvećoj mjeri odgovorni za biološke učinke, kako antimikrobni tako i antioksidacijski učinak.

Posebno su zanimljivi flavonoidi kao fenolni sastojci vina koji predstavljaju izazov u farmaceutskim i farmakološkim istraživanjima kao potencijalna buduća antimikrobna sredstva. Pored istraživanja u strukturnih obilježja s ciljem unapređenja bioloških učinaka, istraživanje mehanizama djelovanja ovih spojeva sve je intenzivnije (40).

Osim flavonoidima, antimikrobni se učinak pripisuje i ne-flavonoidima. Rezultati jedne studije su pokazali da su ne-flavonoidni spojevi, galna kiselina, etil galat i kafeinska kiselina, tirozol, triptofol, bili aktivniji od flavonoida katehina i epikatehina. Ti su rezultati u skladu s Cueva et al. (64), koji su izvijestili o snažnijem inhibicijskom učinku fenolnih kiselina u usporedbi s katehinom i epikatehinom. Za galnu kiselinu i etilni galat utvrđeno je da imaju najširi spektar antimikrobne aktivnosti (62).

Uspoređujući učinke čistih kemijskih spojeva i smjesa tvari, kao što su fenolima-bogati biljni ekstrakti ili pak vino, pokazano je da fenolni ekstrakti ostvaruju snažniji antimikrobni učinak od čistih fenolnih spojeva, ali da je antimikrobni učinak povezan sa fenolnim sadržajem. Na primjer, ekstrakti s višim sadržajem galne kiseline (65), bili su oni koji pokazuju veću antimikrobnu aktivnost. Ovi rezultati sugeriraju da je antimikrobna aktivnost ekstrakata povezana s antimikrobnim učincima njihovih fenolnih spojeva.

Ne treba isključiti ni potencijalni sinergistički učinak pojedinih komponenti ekstrakata (63-65).

S druge strane zanimljiv je rezultat koji pokazuje da veća koncentracija fenolnih spojeva ne znači nužno i porast njihovog antioksidacijskog učinka (39). U našem istraživanju

ovaj trend nije pokazan za antioksidacijski učinak koji je veći u uzorku s većim sadržajem fenola, nego za antimikrobni učinak.

Nadalje, polifenoli su jako osjetljivi na promjene fizikalno-kemijskih svojstava medija u kojem se nalaze. To može dodatno utjecati na njihovu topljivost, taloženje kao i interakciju s proteinima, koji zauzvrat utječu na njihova biokemijska svojstva i biološku aktivnost (5, 66). Maksimalna antioksidacijska aktivnost je bila veća i dogodila se u kraćem vremenu u manje polarnim otapalima kao što je metanol i etanol, dok se povećanjem polarnosti otapala značajno smanjila antioksidacijska aktivnost (67).

Oksidacijski procesi značajno utječu kako na organoleptička svojstva vina, tako i na njegov biokemijski sastav. Promjene su detektibilne čak i jednostavnim spektrofotemetrijskim metodama koje smo koristili i neizravno upućuju ne samo na kvantitativne već i kvalitativne promjene u sadržaju i sastavu fenolnih spojeva.

Opisanim oksidacijskim procesima mjenjaju se brojne komponente vina. Oksidacija fenola posebno privlači pozornost jer rezultira s jedne strane nastankom novih molekula, kinona, a s druge strane čini sustav nestabilnijim, a njegove komponente sklonije međusobnim interakcijama.

Pojava kinona može mjenjati biološke učinke izvornog vina. Uzevši u obzir provedeno istraživanje, to bi značilo da su upravo kinoni potencijalno odgovorni za smanjeni antibakterijski učinak oksidiranog vina. Ipak, koncentraciju kinona u ispitivanim uzorcima nismo mjerili te ovu hipotezu ne možemo potvrditi.

O povećanoj sklonosti stupanja u međusobne interakcije između pojedinih komponenti vina možemo neizravno zaključiti na temelju provedenih mjerenja koncentracije flavanola u uzorvima ispitivanih vina. Sadržaj ovih fenolnih spojeva izmjeren je dvijema metodama (metodom po vanilinu i metodom koja koristi p-DMACA-reagens), koje se međusobno nadopunjuju i neizravno daju podatke ili o koncentracijama ukupnih flavanola koji uključuju i monomere i oligomere (vanilin-metoda, (66)) ili o koncentraciji isključivo monomernih spojeva (DMACA, (67)). Iz rezultata je vidljivo da se u oksidiranom vinu povećala koncentracija ukupnih flavanola, a smanjila koncentracija flavanolnih monomera. Polimerizacija potaknuta oksidacijom nije dovela do snižavanja sadržaja ukupnih fenola, iako je potakla vrlo intenzivnu promjenu boje i taloženje vina (Slika 13) te je pogodovala antioksidacijskom, a smanjivala antimikrobni učinak vina.

Provedeno istraživanje ukazalo je da fizikalno-kemijske promjene koje nastaju spontanom oksidacijom vina imaju značajne i različite učinke na antibakterijsku i antioksidacijsku aktivnost. Ove su promjene posebno izražene u vinima koja su bogatija u

fenolnom sadržaju i proizvedena bez dodavanja konzervansa. U budućnosti se planira provesti ispitivanje kariovaskularnih učinaka oksidiranog i maceriranog bijelog vina Graševine, određivanje antioksidacijske in vitro aktivnosti DPPH (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil-hidrat) i Briggs-Rauscher metodama te u istim uzorcima učiniti HPLC analizu (eng. High Performance Liquid Chromatography, visokodjelotvorna tekućinska kromatografija) pojedinačnih fenolnih spojeva, a posebno oligomernih flavanola.

6. ZAKLJUČAK

Intaktno i oksidirano macerirano bijelo vino ostvaruju antibakterijski učinak protiv *E. coli i S. enterica,* serovar *Enteritidis*. Spontana oksidacija smanjuje antibakterijski učinak maceriranog vina. Vrijeme potrebno za antibakterijski učinak različito je za svaku kombinaciju uzorka vina i bakterijske vrste.

Spontanom oksidacijom vina mijenjaju se i sadržaj i sastav polifenolnih spojeva. U oksidiranom vinu povećava se koncentracija ukupnih fenola, flavonoida i oligomernih flavanola, a smanjuju se koncentracija ne-flavonoida i monomernih flavanola.

Spontana oksidacija vina izaziva suprotne promjene u različitim biološkim učincima; antimikrobni se učinak smanjuje, a antioksidacijski povećava. Ove su promjene su donekle povezane sa promjenama u biokemijskom sastavu oksidiranog vina.

7. LITERATURA

1. Gronbaek M, Deis A, Sorensen TI, Becker U, Schnohr P, Jensen G. Mortality associated with moderate intakes of wine, beer, or spirits. BMJ. svibanj 1995.;310(6988):1165–9.
2. Poli A, Marangoni F, Avogaro A, Barba G, Bellentani S, Bucci M, i ostali. Moderate alcohol use and health: a consensus document. Nutr Metab Cardiovasc Dis. lipanj 2013.;23(6):487–504.
3. Friedman M. Chemistry and multibeneficial bioactivities of carvacrol (4-isopropyl-2-methylphenol), a component of essential oils produced by aromatic plants and spices. J Agric Food Chem. kolovoz 2014.;62(31):7652–70.
4. WATERHOUSE AL. Wine Phenolics. Ann N Y Acad Sci [Internet]. 2002.;957(1):21–36. Dostupno na: http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb02903.x
5. Zanchi D, Vernhet A, Poncet-Legrand C, Cartalade D, Tribet C, Schweins R, i ostali. Colloidal dispersions of tannins in water-ethanol solutions. Langmuir. rujan 2007.;23(20):9949–59.
6. Hrvatska enciklopedija: Vino [Internet]. [citirano 01. siječanj 2017.]. Dostupno na: http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=64729#komentar/
7. Fernandes I, Perez-Gregorio R, Soares S, Mateus N, de Freitas V. Wine Flavonoids in Health and Disease Prevention. Molecules. veljača 2017.;22(2).
8. Ali K, Maltese F, Choi YH, Verpoorte R. Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products. Phytochem Rev [Internet]. 08. rujan 2010.;9(3):357–78. Dostupno na: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2928446/
9. McGovern PE. Ancient Wine The Search for the Origins of Viniculture. 2007. 392 str.
10. Kavalier F. Wine: A Scientific Exploration. BMJ Br Med J [Internet]. 08. ožujak 2003.;326(7388):555. Dostupno na: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1125443/
11. Sandler M, Pinder R. Wine : a scientific exploration [Internet]. New York: Taylor & Francis; 2002. Dostupno na: http://www.crcnetbase.com/isbn/9780415247344
12. Jancis R. No The Oxford Companion to Wine. Oxford University Press; 2006. 746 str.
13. Zakon o vinu [Internet]. Dostupno na: https://www.zakon.hr/z/277/Zakon-o-vinu
14. Williams AA, Rosser PR. Aroma enhancing effects of ethanol. Chem Senses [Internet]. 1981.;6(2):149–53. Dostupno na: +
15. Boban N. Antimikrobni učinci derivata intaktnog vina i termički obrađenog vina na hranom prenosive vrste Salmonella Enterica i Escherichia Coli. 2010.
16. Modun D, Music I, Katalinic V, Dujic Z, Boban M. Glycerol and Ethanol in Red Wine Are Responsible for Urate-Related Increases in Plasma Antioxidant Capacity. Clin Chem [Internet]. 2006.;52(4):785–7. Dostupno na: http://clinchem.aaccjnls.org/content/52/4/785
17. Rasines-Perea Z, Teissedre P-L. Grape Polyphenols' Effects in Human Cardiovascular Diseases and Diabetes. Molecules. 2017.;22(1).
18. Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. Lancet (London, England). lipanj 1992.;339(8808):1523–6.
19. The French Paradox [Internet]. 1991. Dostupno na: https://www.youtube.com/watch?v=njm1LkXP2sg
20. Berger J-L. The Procedures of Winemaking. Paris; 1986. 76-77 str.
21. Puckette M. Savory or Fruity? Understanding Types of White Wine by Color. WIne Folly [Internet]. 2012.; Dostupno na: http://winefolly.com/tutorial/white-wines-by-color/
22. Suhadolnik Ž. Vinske sorte/ Graševina [Internet]. 2013. Dostupno na: https://suhiucasi.wordpress.com/2013/03/07/vinske-sorte-grasevina-tekuci-simbol-slavonije/

23. Harding J, Vouillamoz J. Wine Grapes: A Complete Guide to 1,368 Vine Varieties, Including Their Origins and Flavours. 2012. 220-221 str.
24. Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. Molecules [Internet]. 2013.;18(2):2328–75. Dostupno na: http://www.mdpi.com/1420-3049/18/2/2328
25. Amorati R, Valgimigli L. Modulation of the antioxidant activity of phenols by non-covalent interactions. Org Biomol Chem [Internet]. 2012.;10(21):4147–58. Dostupno na: http://dx.doi.org/10.1039/C2OB25174D
26. Jennifer J. Clinical Guide to Nutrition and Dietary Supplements in Disease Management. Churchill Livingstone; 2003. 472 str.
27. Teixeira A, Eiras-Dias J, Castellarin SD, Gerós H. Berry Phenolics of Grapevine under Challenging Environments. Int J Mol Sci [Internet]. 2013.;14(9):18711–39. Dostupno na: http://www.mdpi.com/1422-0067/14/9/18711
28. Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. J Clin Lab Anal. 1997.;11(5):287–313.
29. Melidou M, Riganakos K, Galaris D. Protection against nuclear DNA damage offered by flavonoids in cells exposed to hydrogen peroxide: the role of iron chelation. Free Radic Biol Med [Internet]. 2005.;39(12):1591—1600. Dostupno na: https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.08.009
30. Xia E-Q, Deng G-F, Guo Y-J, Li H-B. Biological Activities of Polyphenols from Grapes. Int J Mol Sci [Internet]. 2010.;11(2):622–46. Dostupno na: http://www.mdpi.com/1422-0067/11/2/622
31. Jackson RS. Wine Science: Principles and Applications. 2008.
32. Selma M V, Freitas PM, Almela L, González-Barrio R, Espín JC, Suslow T, i ostali. Ultraviolet-C and Induced Stilbenes Control Ochratoxigenic Aspergillus in Grapes. J Agric Food Chem [Internet]. 2008.;56(21):9990–6. Dostupno na: http://dx.doi.org/10.1021/jf8018062
33. Prescott LM, Harley JP, Klein DA. Microbiology. McGraw-Hill Higher Education; 2006.
34. Raj SB, Ramaswamy S, Plapp B V. Yeast Alcohol Dehydrogenase Structure and Catalysis. Biochemistry [Internet]. 2014.;53(36):5791–803. Dostupno na: http://dx.doi.org/10.1021/bi5006442
35. Bagaturia N. Georgian wine making. Tbilisi: Theory and practice; 2010.
36. Narančasto vino. 2013.; Dostupno na: http://www.gospodarski.hr/Publication/2013/17/naranasto-vino/7860#.WdIopktDuM8)
37. Waterhouse AL, Laurie VF. Oxidation of Wine Phenolics: A Critical Evaluation and Hypotheses. Am J Enol Vitic [Internet]. 01. rujan 2006.;57(3):306 LP-313. Dostupno na: http://www.ajevonline.org/content/57/3/306.abstract
38. Castellari M, Simonato B, Tornielli G battista, Spinelli P, Ferrarini R. Effect of different enological treatment on dissolved oxygen in wines. Ital J Food Sci. 2004.;16:387–96.
39. Singleton VL. Oxygen with Phenols and Related Reactions in Musts, Wines, and Model Systems: Observations and Practical Implications. Am J Enol Vitic [Internet]. 1987.;38(1):69–77. Dostupno na: http://www.ajevonline.org/content/38/1/69
40. Laurie VF, Waterhouse AL. Oxidation of Glycerol in the Presence of Hydrogen Peroxide and Iron in Model Solutions and Wine. Potential Effects on Wine Color. J Agric Food Chem [Internet]. 2006.;54(13):4668–73. Dostupno na: http://dx.doi.org/10.1021/jf053036p
41. Prochazkova D, Bousova I, Wilhelmova N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. Fitoterapia. lipanj 2011.;82(4):513–23.

42. Weisse ME, Eberly B, Person DA. Wine as a digestive aid: comparative antimicrobial effects of bismuth salicylate and red and white wine. BMJ. prosinac 1995.;311(7021):1657–60.
43. Møretrø T, Daeschel MA. Wine is Bactericidal to Foodborne Pathogens. J Food Sci [Internet]. 2004.;69(9):M251--M257. Dostupno na: http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb09938.x
44. Fernandes J, Gomes F, Couto JA, Hogg T. The antimicrobial effect of wine on Listeria innocua in a model stomach system. Food Control [Internet]. 2007.;18(12):1477–83. Dostupno na: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713506002684
45. Boban N, Tonkic M, Budimir D, Modun D, Sutlovic D, Punda-Polic V, i ostali. Antimicrobial effects of wine: separating the role of polyphenols, pH, ethanol, and other wine components. J Food Sci. lipanj 2010.;75(5):M322-6.
46. Rodriguez Vaquero MJ, Aredes Fernandez PA, Manca de Nadra MC, Strasser de Saad AM. Phenolic compound combinations on Escherichia coli viability in a meat system. J Agric Food Chem. svibanj 2010.;58(10):6048–52.
47. Grbić L. Crijevne bolesti [Internet]. Dostupno na: http://www.leko-grbic.hr/hrv/edukacija=crijevne_bolesti_2.html
48. Karlowsky JA, Kelly LJ, Thornsberry C, Jones ME, Sahm DF. Trends in antimicrobial resistance among urinary tract infection isolates of Escherichia coli from female outpatients in the United States. Antimicrob Agents Chemother [Internet]. kolovoz 2002. [citirano 22. travanj 2017.];46(8):2540–5. Dostupno na: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12121930
49. Singleton P. Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine. Wiley; 1999. 444-454 str.
50. Meštrović T. Escherichia Coli [Internet]. [citirano 01. siječanj 2017.]. Dostupno na: http://www.plivazdravlje.hr/aktualno/clanak/26315/Escherichia-coli.html
51. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiology: An Introduction. 2010. 85-87 str.
52. Fotadar U, Zaveloff P, Terracio L. Growth of Escherichia coli at elevated temperatures. J Basic Microbiol [Internet]. 2005.;45(5):403–4. Dostupno na: http://dx.doi.org/10.1002/jobm.200410542
53. Ingledew WJ, Poole RK. The respiratory chains of Escherichia coli. Microbiol Rev [Internet]. 01. rujan 1984.;48(3):222–71. Dostupno na: http://mmbr.asm.org/content/48/3/222.short
54. Escherichia coli (Migula) Castellani and Chalmers (ATCC® 25922-MINI-PACK™). Dostupno na: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/25922-MINI-PACK.aspx#generalinformation
55. Su L-H, Chiu C-H. Salmonella: clinical importance and evolution of nomenclature. Chang Gung Med J. 2007.;30(3):210–9.
56. Sorrells KM, Speck ML, Warren JA. Pathogenicity of Salmonella gallinarum after metabolic injury by freezing. Appl Microbiol. siječanj 1970.;19(1):39–43.
57. Beuchat LR, Heaton EK. Salmonella survival on pecans as influenced by processing and storage conditions. Appl Microbiol. lipanj 1975.;29(6):795–801.
58. Clark MA, Barrett EL. The phs gene and hydrogen sulfide production by Salmonella typhimurium. J Bacteriol [Internet]. 01. lipanj 1987.;169(6):2391–7. Dostupno na: http://jb.asm.org/content/169/6/2391.abstract
59. Alvarez J, Sota M, Vivanco AB, Perales I, Cisterna R, Rementeria A, i ostali. Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of salmonella in human clinical samples. J Clin Microbiol. travanj 2004.;42(4):1734–8.
60. Hoorfar J, Ahrens P, Rådström P. Automated 5′ Nuclease PCR Assay for Identification of Salmonella enterica . J Clin Microbiol [Internet]. 01. rujan 2000.;38(9):3429–35.

Dostupno na: http://jcm.asm.org/content/38/9/3429.abstract
61. Braden CR. Salmonella enterica Serotype Enteritidis and Eggs: A National Epidemic in the United States. Clin Infect Dis [Internet]. 2006.;43(4):512. Dostupno na: +
62. Salmonella enterica subsp. enterica (ex Kauffmann and Edwards) Le Minor and Popoff serovar Enteritidis (ATCC® 13076™). Dostupno na: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/13076.aspx#generalinformation
63. Katalinic V, Generalić Mekinić I, Skroza D, Ljubenkov I, Teskera A, Konta I, i ostali. Insight in the phenolic composition and antioxidative properties of Vitis vinifera leaves extracts. Croat J Food Sci Technol. 2009.;1:7–15.
64. Cueva C, Mingo S, Muñoz-González I, Bustos I, Requena T, del Campo R, i ostali. Antibacterial activity of wine phenolic compounds and oenological extracts against potential respiratory pathogens. Lett Appl Microbiol [Internet]. 2012.;54(6):557–63. Dostupno na: http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03248.x
65. Tabasco R, Sanchez-Patan F, Monagas M, Bartolome B, Victoria Moreno-Arribas M, Pelaez C, i ostali. Effect of grape polyphenols on lactic acid bacteria and bifidobacteria growth: resistance and metabolism. Food Microbiol. listopad 2011.;28(7):1345–52.
66. S. Ough C, A. (Maynard Andrew) Amerine M. Methods for analysis of musts and wines / C.S. Ough and M.A. Amerine. SERBIULA (sistema Libr 20). 2017.;
67. Arnous A, Makris D, Kefalas P. Correlation of Pigment and Flavanol Content with Antioxidant Properties in Selected Aged Regional Wines from Greece. J Food Compos Anal. 2002.;15:655–65.

8. SAŽETAK

Naslov: Utjecaj oksidacije na antimikrobni učinak vina.

Cilj istraživanja: Iako se prilikom pijenja vina često događa da vino stoji u otvorenoj boci te je podložno oksidaciji do sada je u potpunosti neistraženo utječe li oksidacija na biološke učinke vina. Stoga su ciljevi ovog istraživanja bili utvrditi dolazi li do promjene antimikrobnog učinka maceriranog bijelog vina Graševine nakon spontane oksidacije tijekom 48 sati; ispitati utječe li spontana 48-satna oksidacija vina na njegov biokemijski sastav i antioksidacijski učinak *in vitro* te usporediti promjene antimikrobnog i antioksidacijskog učinka vina.

Materijali i metode: Macerirano bijelo vino Graševina Kuvlakhe, vinarija Krauthaker, Kutjevo, berba 2015. godine proizvedeno je postupkom u kojem se spontana fermentacija grožđanog soka odvijala u dodiru s biljnim materijalom. Nakon toga su se bez uklanjanja sjemenki i pokožica grožđa, tankovi vina hermetički zatvorili omogućavajući vinu daljnje sazrijevanje pri konstantnoj temperaturi i bez doticaja sa zrakom tijekom 120 dana. Oksidirano macerirano bijelo vino dobilo se nakon otvaranje boce izlaganjem zraku tijekom 48 sati. Sadržaj i sastav ukupnih fenola određen je spektrofotometrijskim metodama. Antioksidacijski učinci mjereni su FRAP (engl. Ferric reducing antioxidant power) metodom, a enološki fizikalno-kemijski parametri standardnim enološkim metodama. Antimikrobni učinak ispitan je inokulacijom bakterijskih suspenzija s vinom na ploče s krvim agarom u unaprijed određenim vremenskim razmacima, u duplikatu. Nakon 24-satne inkubacije vizualno se vršila detekcija bakterijskih kolonija, do pronalaska ploče s izostankom vidljivog porasta.

Rezultati: Spontana oksidacija značajno je promijenila sadržaj ukupnih fenola, te pojedinih fenolnih skupina. Sadržaj je ukupnih fenola i flavonoida bio veći nakon oksidacije. Oksidacija je povećala i sadržaj ukupnih flavanola, a smanjila sadržaj monomernih spojeva i ne-flavonoida. Oba su ispitivana uzorka vina ostvarila antibakterijski učinak protiv *E. coli* i S. *enterica,* serovar *Enteritidis*. Intaktno je macerirano vino pokazalo superiorniju antibakterijsku aktivnost u odnosu na oksidirano macerirano vino na obje bakterijske vrste, s vremenom inkubacije koje je bilo različito za svaku kombinaciju uzorka vina i bakterijske vrste.

Zaključci: Spontana je oksidacija vina izazvala suprotne promjene u različitim biološkim učincima; antimikrobni se učinak smanjuje, a antioksidacijski povećava. Ove su promjene su donekle povezane sa promjenama u biokemijskom sastavu oksidiranog vina.

Rad je proveden u sklopu istraživačkog projekta 8652 Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ) „Biološki učinci vina: utjecaj vinifikacijske tehnologije, dealkoholizacije i starenja vina“, voditelja prof. dr. sc. Mladena Bobana.

9. SUMMARY

Diploma thesis title: The influence of oxidation on antimicrobial effect of wine.

The research goal: It is completely unexplored whether the oxidation affects the biological effects of the wine, although it often happens that while drinking wine, we open the bottle and the wine remains in the open bottle susceptible to oxidation. Therefore, the aims of this study were to determine the antimicrobial effect of macerated white Graševina after spontaneous oxidation for 48 hours; to examine whether wine oxidation affects its biochemical composition and antioxidant effect *in vitro* and to compare the changes in antimicrobial and antioxidant effects induced by wine oxidation

Materials and Methods: Macerated white wine Graševina Kuvlakhe, Krauthaker winery, Kutjevo, vintage 2015, was produced by process of spontaneous grape fermentation of fermented juice in contact with plant material. Without removing grape seeds and skins, the wine tanks were hermetically closed, allowing wine maturation at constant temperature and without contact with the air for 120 days. Oxidized macerated white wine was obtained after opening the bottle by exposing the wine to the air for 48 hours. The content and composition of the total phenols is determined spectrophotometrically. Antioxidant effects were measured by FRAP (Ferric reducing antioxidant power) method, and enological physical-chemical parameters by standard enological methods. The antimicrobial effect was investigated by inoculation of bacterial suspensions with wine on blood agar plates at predetermined time intervals, in duplicate. After 24-hour incubation, visualization of bacterial colonies was performed until the plate with no apparent bacterial growth was found.

Results: Spontaneous oxidation significantly changed the content of total phenols and certain phenolic groups. The content of total phenols and flavonoids was higher after oxidation. Oxidation also increased the content of total flavanols, and reduced the content of monomeric compounds and non-flavonoids. Both of the tested wine samples showed antibacterial effect against *E. coli* and *S. enterica,* serovar *Enteritidis*. The intact macerated wine showed superior antibacterial activity relative to oxidized macerated wine against both bacterial species with incubation time different for each combination of wine and bacterial species.

Conclusions: Spontaneous oxidation of wine caused opposite changes in various biological effects; the antimicrobial effect decreased and antioxidant increased. These changes are somewhat related to changes in the biochemical composition of oxidized wine.

This work was supported by Croatian Science Foundation (HRZZ), project 8652 "Biological effects of wine: the influence of vinification technology, dealcoholization and aging of wine", project leader prof. Mladen Boban.

10. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Anaanđela Galiotović
Mobitel: 097/ 694- 2605
Elektronska pošta: anaandela.galiotovic@gmail.com
Državljanstvo: hrvatsko
Datum i mjesto rođenja: 26. svibnja 1994. godine, Split

Obrazovanje

2000. – 2008. Osnovna škola Marka Marulića, Sinj
2008. – 2012. Franjevačka klasična gimnazija, smjer jezični, Sinj
2012. – 2017. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, Farmacija

Strani jezici

Engleski jezik: aktivno znanje
Njemački jezik: osnovno znanje