

Antimikrobni učinak nusproizvoda vinifikacije

Spajić, Marija

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:282768>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

ANTIMIKROBNI UČINAK NUSPROIZVODA
VINIFIKACIJE

ZAVRŠNI RAD

MARIJA SPAJIĆ

Matični broj: 105

Split, srpanj 2023.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA

ANTIMIKROBNI UČINAK NUSPROIZVODA VINIFIKACIJE

ZAVRŠNI RAD

MARIJA SPAJIĆ

Matični broj: 105

Split, srpanj 2023.

**UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
UNDERGRADUATE STUDY OF FOOD TECHNOLOGY**

ANTIMICROBIAL EFFECT OF VINIFICATION BY-PRODUCTS

BACHELOR THESIS

MARIJA SPAJIĆ

Parent number: 105

Split, July 2023

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Mentor: Izv. prof. dr. sc. Danijela Skroza
Pomoć pri izradi: Mag. ing. agr. Roberta Frleta Matas

ANTIMIKROBNI UČINAK NUSPROIZVODA VINIFIKACIJE

Marija Spajić, 105

Sažetak: Tijekom procesa prerade grožđa i proizvodnje vina nastaju velike količine vrijednih nusproizvoda, poput komine grožđa, peteljki i vinskog taloga. Svi navedeni nusproizvodi pokazuju brojna biološka svojstva od kojih se izdvajaju antioksidacijska i antimikrobna aktivnost. Zbog navedenih svojstava nusproizvodi imaju potencijal za daljnju uporabu, a njihovim iskorištenjem doprinijet će se rješavanju problema sve veće količine organskog otpada nastalog tijekom postupka vinifikacije. Komina, kao količinski najzastupljeniji nusproizvod, bogata je bioaktivnim fitokemikalijama, osobito polifenolima. Međutim, vrlo često se vinski talog zanemaruje, a jednako je vrijedan nusproizvod jer je bogat fenolima, vitaminima i ugljikohidratima. U ovome radu ispitana je antimikrobna aktivnost ekstrakata taloga bijelog, crnog i rosé vina na patogene bakterije (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* i *Staphylococcus aureus*) i bakterije kvarenja (*Pseudomonas aeruginosa* i *Pseudomonas fragi*). Korištene sorte su *Malvasija dubrovačka* i *Plavac mali*. Analize su provedene korištenjem tri različite metode: metodom određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (eng. *Minimal Inhibitory Concentration*, MIC), metodom određivanja minimalne baktericidne koncentracije (eng. *Minimal Bactericidal Concentration*, MBC) i metodom difuzije u jažicama (engl. *Well diffusion method*). Dobiveni rezultati ukazuju na bolju antimikrobnu aktivnost ekstrakata vinskog taloga prema bakterijama kvarenja u odnosu na patogene bakterije. Najbolju aktivnost, odnosno najniže MIC i MBC vrijednosti (25,5 mg GAE/L) pokazao je uzorak bijelog vina dobiven maceracijom masulja u trajanju od 24 sata prije početka fermentacije i to prema bakterijama kvarenja *P. aeruginosa* i *P. fragi*.

Ključne riječi: vinski talog, fenolni spojevi, antimikrobna aktivnost, MIC, MBC

Rad sadrži: 25 stranica, 8 slika, 3 tablice, 36 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

1. Doc. dr. sc. Ivona Nuić - predsjednik
2. Izv. prof. dr. sc. Miće Jakić – član
3. Izv. prof. dr. sc. Danijela Skroza – član – mentor

Datum obrane:

Rad je u tiskanom i elektroničkom (PDF) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35, u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice u Splitu te u javnoj internetskoj bazi završnih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice.

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology in Split
Undergraduate Study of Food Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Mentor: Ph. D. Danijela Skroza, Associate Professor

Technical assistance: Ph. D. Student, Roberta Frleta Matas

ANTIMICROBIAL EFFECT OF VINIFICATION BY-PRODUCTS

Marija Spajić, 105

Summary: Grape processing and winemaking produce large quantities of valuable by-products, such as grape pomace, stems, and wine lees. All the mentioned by-products have numerous biological properties, among which the antioxidant and antimicrobial activity stand out. Due to the mentioned properties, the by-products have the potential for further use, and their utilization will help to solve the problem of the increasing amount of organic waste generated during the winemaking process. Pomace, the most represented by-product in terms of quantity, is rich in bioactive phytochemicals, especially polyphenols. Very often, however, the wine lees are overlooked, being an equally valuable by-product because they are rich in phenols, vitamins and carbohydrates. In this thesis, the antimicrobial activity of extracts of white, red and rosé wine less against pathogenic bacteria (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*) and spoilage bacteria (*Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fragi*) was tested. The varieties used are *Malvasija dubrovačka* and *Plavac mali*. The analyzes were carried out using three different methods: the minimum inhibitory concentration (MIC), the minimum bactericidal concentration (MBC) and well diffusion method. The results obtained indicate a better antimicrobial activity of the wine less extracts determined by the MIC and MBC methods against spoilage bacteria compared to pathogenic bacteria. The best activity, i.e. the lowest MIC and MBC values (25.5. mg GAE/L) determined by all methods, was shown by a white wine obtained by maceration of grape must in a period of 24 hours before the start of fermentation, against to spoilage bacteria *P. aeruginosa* and *P. fragi* compared to the pathogenic bacteria tested.

Keywords: wine lees, phenolic compounds, antimicrobial activity, MIC, MBC

Thesis contains: 25 pages, 8 figures, 3 tables, 36 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Ph. D. Ivona Nuić, Assistant Professor - chair person
2. Ph. D. Miće Jakić, Associate Professor – member
3. Ph. D. Danijela Skroza, Associate Professor – supervisor

Defence date:

Printed and electronic (PDF) form of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology in Split, Ruđera Boškovića 35, in the public library database of the University of Split Library and in the digital academic archives and repositories of the National and University Library.

Završni rad je izrađen u Zavodu za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Danijele Skroza i neposrednim vodstvom mag. ing. agr. Roberte Frleta Matas, u razdoblju od veljače do lipnja 2023. godine.

Ovaj rad je sufinanciran sredstvima projekta BioProMedFood (Reference Number: I467; 2019-SECTION2-4).

ZAHVALA

Želim zahvaliti svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Danijeli Skroza na savjetima, strpljenju te uloženom vremenu i trudu koje je pružila u izradi ovog završnog rada. Također, zahvaljujem i mag. ing. agr. Roberti Frleta Matas čija je pomoć pri provedbi eksperimentalnog rada bila od velikog značaja.

Zahvaljujem svojoj obitelji, osobito roditeljima bez kojih ništa ne bi bilo moguće jer su me uvijek podržavali i motivirali. Hvala i svim prijateljima bez kojih studiranje ne bi bilo tako zabavno.

I na kraju, hvala mom Josipu na razumijevanju, potpori i pomoći u svakom trenutku ovog puta.

HVALA!

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

Zadatak završnog rada bio je:

- Pripraviti ekstrakte od nusproizvoda vinifikacije bijelog vina, sorte *Malvasija dubrovačka* te crnog i rosé vina, sorte *Plavac mali*.
- Ispitati antimikrobnu aktivnih navedenih ekstrakata nusproizvoda na patogene bakterije (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*) i bakterije kvarenja (*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fragi*).
- Antimikrobnu aktivnost odrediti korištenjem triju različitih metoda: metodom određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (eng. *Minimal Inhibitory Concentration*, MIC), metodom određivanja minimalne baktericidne koncentracije (eng. *Minimal Bactericidal Concentration*, MBC) i metodom difuzije u jažicama (eng. *Well diffusion method*).
- Analizirati dobivene rezultate i donijeti zaključke o antimikrobnoj aktivnosti ispitivanih ekstrakata vinskih taloga.
- Na osnovu dobivenih rezultata donijeti zaključak o mogućnosti primjene nusproizvoda zaostalih tijekom vinifikacije u prehrambenoj industriji.

SAŽETAK

Tijekom procesa prerade grožđa i proizvodnje vina nastaju velike količine vrijednih nusproizvoda, poput komine grožđa, peteljki i vinskog taloga. Svi navedeni nusproizvodi pokazuju brojna biološka svojstva od kojih se izdvajaju antioksidacijska i antimikrobna aktivnost. Zbog navedenih svojstava nusproizvodi imaju potencijal za daljnju uporabu, a njihovim iskorištenjem doprinijet će se rješavanju problema sve veće količine organskog otpada nastalog tijekom postupka vinifikacije. Komina, kao količinski najzastupljeniji nusproizvod, bogata je bioaktivnim fitokemikalijama, osobito polifenolima. Međutim, vrlo često se vinski talog zanemaruje, a jednako je vrijedan nusproizvod jer je bogat fenolima, vitaminima i ugljikohidratima. U ovome radu ispitana je antimikrobna aktivnost ekstrakata taloga bijelog, crnog i rosé vina na patogene bakterije (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* i *Staphylococcus aureus*) i bakterije kvarenja (*Pseudomonas aeruginosa* i *Pseudomonas fragi*). Korištene sorte su *Malvasija dubrovačka* i *Plavac mali*. Analize su provedene korištenjem tri različite metode: metodom određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (eng. *Minimal Inhibitory Concentration*, MIC), metodom određivanja minimalne baktericidne koncentracije (eng. *Minimal Bactericidal Concentration*, MBC) i metodom difuzije u jažicama (engl. *Well diffusion method*). Dobiveni rezultati ukazuju na bolju antimikrobnu aktivnost ekstrakata vinskog taloga prema bakterijama kvarenja u odnosu na patogene bakterije. Najbolju aktivnost, odnosno najniže MIC i MBC vrijednosti (25,5 mg GAE/L) pokazao je uzorak bijelog vina dobiven maceracijom masulja u trajanju od 24 sata prije početka fermentacije prema bakterijama kvarenja *P. aeruginosa* i *P. fragi*.

Ključne riječi: vinski talog, fenolni spojevi, antimikrobna aktivnost, MIC, MBC

SUMMARY

Grape processing and winemaking produce large quantities of valuable by-products, such as grape pomace, stems and wine lees. All the mentioned by-products have numerous biological properties, among which the antioxidant and antimicrobial activity stand out. Due to the mentioned properties, the by-products have the potential for further use, and their utilization will help to solve the problem of the increasing amount of organic waste generated during the winemaking process. Pomace, the most represented by-product in terms of quantity, is rich in bioactive phytochemicals, especially polyphenols. Very often, however, the wine lees are overlooked being an equally valuable by-product because they are rich in phenols, vitamins and carbohydrates. In this thesis, the antimicrobial activity of extracts of white, red and rosé wine less against pathogenic bacteria (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*) and spoilage bacteria (*Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fragi*) was tested. The varieties used are *Malvasija dubrovačka* and *Plavac mali*. The analyzes were carried out using three different methods: the minimum inhibitory concentration (MIC), the minimum bactericidal concentration (MBC) and well diffusion method. The results obtained indicate a better antimicrobial activity of the wine less extracts determined by the MIC and MBC methods against spoilage bacteria compared to pathogenic bacteria. The best activity, i.e. the lowest MIC and MBC values (25.5 mg GAE/L) determined by all methods, was shown by a white wine obtained by maceration of grape must in a period of 24 hours before the start of fermentation against to spoilage bacteria *P. aeruginosa* and *P. fragi* compared to the pathogenic bacteria tested.

Keywords: wine lees, phenolic compounds, antimicrobial activity, MIC, MBC

SADRŽAJ

UVOD	1
1.OPĆI DIO	2
1.1. Nusproizvodi u proizvodnji vina.....	2
1.2. Kemijski sastav i biološki potencijal nusproizvoda vinarstva	4
1.3. Primjena nusproizvoda vinarstva u prehrambenoj industriji	8
2. EKSPERIMENTALNI DIO	10
2.1. Reagensi	10
2.2. Uređaji.....	10
2.3. Materijal	10
2.4. Bakterijske kulture	12
2.5. Metode određivanja antimikrobne aktivnosti.....	12
2.5.1. Priprema i kontrola inokuluma	12
2.5.2. Metoda određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC metoda)....	13
2.5.3. Metoda određivanja minimalne baktericidne koncentracije (MBC metoda)	15
2.5.4. Metoda difuzije u jažicama	16
3. REZULTATI I RASPRAVA	17
3.1. Rezultati određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i minimalne baktericidne koncentracije (MBC).....	17
3.2. Rezultati određivanja antimikrobne aktivnosti metodom difuzije u jažicama.....	19
4. ZAKLJUČCI	21
5. LITERATURA	22

UVOD

Vino se definira kao prehrambeni proizvod dobiven djelomičnim ili potpunim alkoholnim vrenjem mošta (groždanog soka) ili masulja (zgnječenog grožđa s peteljka ili bez peteljki). Grožđe koje se koristi za proizvodnju vina mora biti svježije i pogodno za proizvodnju, odnosno, zdravo, dovoljno zrelo i mora sadržavati najmanje 133 g/L šećera.¹ Prema boji, vina se dijele na bijela, ružičasta (rosé) i crna (crvena) vina.²

Glavne komponente vina su voda, alkohol, šećer te organske kiseline, fenoli, esteri i terpeni koji su zaslužni za okus i aromu vina. Među navedenim komponentama, najznačajniji su polifenoli koji su znatno zastupljeniji u crnim vinima nego u bijelim.³

Literaturni podaci navode da u vinarstvu godišnje nastaju velike količine organskog otpada, odnosno nusproizvoda, koji predstavljaju ekološki problem koji se nastoji riješiti ponovnom uporabom. Nusproizvodi vina koji imaju potencijal za daljnje korištenje su: vinski talog, peteljke i komina. Komina je najzastupljeniji nusproizvod i sastoji se od pokožice grožđa, sjemenki, pulpe i peteljki čiji odnos ovisi o brojnim uvjetima poput sorte i zrelosti grožđa. Zahvaljujući svom sastavu i biološkim svojstvima, komina je privukla pozornost znanstvenika i prehrambene industrije i danas se sve više istražuje. U odnosu na kominu, vinski talog je uglavnom manje iskorišten zbog skupog zbrinjavanja unatoč bogatom udjelu vitamina (naročito skupine B), ugljikohidrata i biomase kvasaca.⁴

Pregledom dostupne literature i istraživanja može se zaključiti da navedeni nusproizvodi posjeduju izniman nutritivni sastav zbog kojeg se naveliko koriste u prehrambenoj industriji s ciljem poboljšanja svojstava hrane. Također, ističe se i njihov snažan antioksidacijski i antimikrobni učinak. Studije u kojima se nusproizvodi dodaju prehrambenim proizvodima, kao što je npr. riža, jogurt i mesne prerađevine, pokazuju pozitivan utjecaj ponajviše na udio fenola, antioksidacijska i antimikrobna svojstva te organoleptička svojstva hrane.⁴

Sukladno navedenom, cilj ovog rada bio je odrediti antimikrobni potencijal vinskog taloga, nusproizvoda vinifikacije grožđa sorti *Malvasija dubrovačka* i *Plavac mali* na patogene bakterije: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* i *Staphylococcus aureus* te na bakterije kvarenja: *Pseudomonas aeruginosa* i *Pseudomonas fragi*.

1.OPĆI DIO

1.1. Nusproizvodi u proizvodnji vina

Većina svjetske proizvodnje grožđa koristi se za proizvodnju vina i jakih alkoholnih pića, a proces proizvodnje vina karakterizira stvaranje velike količine otpada i nusproizvoda. Nusproizvodi koji nastaju tijekom proizvodnje vina su komina, sjemenke, peteljke, pokožica i vinski talog.⁴

Komina grožđa (slika 1) predstavlja glavni čvrsti ostatak koji nastaje tijekom prešanja i fermentacije u procesu proizvodnje vina. Uglavnom se sastoji od pokožice, sjemenki i peteljki, i ima visok sadržaj bioaktivnih fitokemikalija, posebice polifenola. Količina komine grožđa zaostala tijekom procesa vinifikacije ovisi o različitim čimbenicima, kao što su sorta grožđa, karakteristike tla, proces proizvodnje vina pa čak i vrsta opreme koja se koristi.⁵



Slika 1. Komina grožđa⁶

Pokožica grožđa predstavlja glavni sastojak komine, čineći približno 50% ukupne mase te je karakterizirana visokim sadržajem vlakana i šećera. Sadržaj vlakana je varijabilan i kreće se u rasponu od 51-56% težine u crnom grožđu i 17-28% u bijelom grožđu. U crnom grožđu se također nalaze antocijanini i tanini, fenolni spojevi zaslužni za razvoj boje u vinu i povećavanje koncentracije postojećih pigmenata za 40%.⁵

Sjemenke grožđa su nusproizvod koji se također nalazi u komini i koji čini čak 2,4 milijuna tona otpada godišnje u proizvodnji vina.⁴ Sjemenke grožđa čine dodatnih 25% težine komine grožđa i sadrže uglavnom ulje, oko 8-20% težine.⁵ Sjemenke se također sastoje od 11% proteina, 35% vlakana, 3% minerala, 7% vode, 7-20% lipida i 7% fenolnih spojeva. Unatoč tome što sjemenke obiluju brojnim vrijednim spojevima, najproučavanije komponente i dalje su fenoli i ulje sjemenki grožđa. Ulje sjemenki grožđa sastoji se od mononezasićenih i polinezasićenih masnih kiselina (90%), osobito linolenske kiseline (58-78%) i oleinske kiseline (3-15%) te manje količine zasićenih masnih kiselina od kojih se ističu palmitinska i stearinska masna kiselina. Osim zasićenih i nezasićenih masnih kiselina, ulje sjemenki ima i visok sadržaj vitamina E, fenola te fitosterola. Od fenolnih spojeva najzastupljeniji su flavonoidi, karotenoidi, fenolne kiseline, tanini i stilbeni. Prinos ulja ovisi o čimbenicima okoliša, uvjetima kultivara, sorti grožđa, tehnici ekstrakcije i vrsti otapala.⁷

Peteljka je kostur grozda i čini oko 25% težine komine grožđa, odnosno 14% krutog otpada u procesu vinifikacije.^{4,5} Peteljke se uglavnom sastoje od lignificiranih tkiva, zbog velike količine vlakana kao što su celuloza (30-36%), hemiceluloza (21-25%) i lignin (17-40%). Također se smatraju dragocjenim izvorom vrijednih spojeva poput tanina, odnosno procijanidina.⁵ Poznato je da peteljke poboljšavaju aromatičnu složenost i svježinu vina, no isto tako mogu biti zaslužne i za zelene note i trpkost. Primjena peteljki u procesu proizvodnje vina, kao i njihov utjecaj na aromu vina ovisi o nekoliko parametara kao što su sorta grožđa, stanje peteljki, uvjeti berbe, sazrijevanje itd.⁸

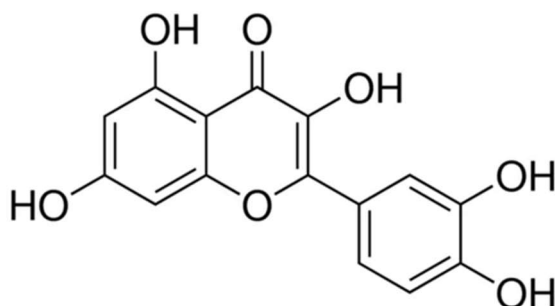
Vinski talog je ostatak koji se stvara na dnu posude nakon fermentacije, tijekom skladištenja, ili kao ostatak dobiven nakon filtracije i/ili centrifugiranja vina. Vinski talog se može svrstati u tri skupine ovisno o stupnju vinifikacije: talog prvog i drugog vrenja te talog od starenja vina. Talozni prvog i drugog vrenja nastaju tijekom alkoholne, odnosno malolaktičke fermentacije, dok talog od starenja vina nastaje odležavanjem vina u bačvama. Vinski talog se također može klasificirati ovisno o veličini čestica na teški talog (između 100 μm i 2 mm, taloži se unutar 24 sata) i lagani talog (<100 μm , između 1 i 24 nm, u suspenziji najmanje 24 sata nakon miješanja). Glavne karakteristike vinskog taloga su kiseli pH (između 3 i 6), kemijska potreba za kisikom iznad 30 000 mg/L, razina kalija oko 2500 mg/L i fenolni spojevi u količinama do 1000 mg/L. Ovaj nusproizvod vinarstva sastoji se od krute i tekuće frakcije. Čvrstu frakciju čine kombinacija kvasaca, organskih kiselina (uglavnom vinske kiseline), netopljivih ugljikohidrata (kao što su celulozni ili hemicelulozni materijali), anorganskih soli, lignina, proteina, fenolnih spojeva te pulpe i

drugih dijelova grožđa. Tekuća frakcija se uglavnom sastoji od etanola i organskih kiselina, kao što su mliječna i octena kiselina. Sastav vinskog taloga ovisi o okolišnim uvjetima, regijama podrijetla i njihovim agronomskim karakteristikama, sorti grožđa i vremenu odležavanja u drvenim bačvama.⁹ Iako je vrlo često najmanje iskorišten nusproizvod pri proizvodnji vina ponekad se koristi za odležavanje bijelih i/ili crnih vina te pjenušavih vina.^{4,9}

1.2. Kemijski sastav i biološki potencijal nusproizvoda vinarstva

Vinogradarska industrija proizvodi velike količine nusproizvoda (komina, sjemenke, vinski talog, pokožica, listovi vinove loze) koji su bogat izvor bioaktivnih spojeva. Važno je naglasiti da na udio bioaktivnih spojeva u grožđu utječu različiti čimbenici uključujući sortu, zrelost, skladištenje nakon berbe, čimbenike okoliša kao što su lokacija, svjetlosni uvjeti, temperatura, prehrana, voda, mikroorganizmi i vinogradarska praksa.

Glavni fenolni spojevi u bobicama grožđa su hidroksicimetne kiseline, stilbeni, flavonoidi uključujući antocijane i proantocijanidine. Flavonoid kvercetin i stilben resveratrol snažni su antioksidansi za koje je dokazano da imaju brojne pozitivne učinke na ljudsko zdravlje, osobito u zaštiti od kardiovaskularnih bolesti. Na snižavanje kolesterola i krvnog tlaka pozitivno djeluju i kondenzirani tanini ili proantocijanadini. Grožđe je također bogato fitosterolima i masnim kiselinama.¹⁰



Slika 2. Struktura kvercetina¹¹

Komina grožđa sadrži visoku razinu polifenola, a znanstveni radovi navode da je njihov udio koji zaostaje u komini oko 70%. Glavni fenolni spojevi u komini grožđa klasificiraju se u dvije skupine: flavonoidni fenoli (antocijani, flavanoli, flavonoli i tanini) i neflavonoidni fenoli (fenolne kiseline). Antocijani su pigmenti koji su lokalizirani uglavnom u pokožici crvenog grožđa, dok su flavonoidi lokalizirani u sjemenkama i peteljicama. Fenolni spojevi u ekstraktima komine grožđa pokazuju antioksidacijska, antikancerogena i antidijabetička svojstva kao i antibakterijsko djelovanje protiv brojnih patogenih bakterija. Antioksidacijska aktivnost fenolnih spojeva zasniva se na njihovoj sposobnosti hvatanja slobodnih radikala i keliranju metala na koje uglavnom utječe broj OH- skupina, kao i njihov položaj u fenolnom prstenu. S druge strane, antimikrobno djelovanje se temelji na sposobnosti vezanja izvanstaničnih i topljivih proteina omogućujući stvaranje kompleksa bakterijskom staničnom stjenkom. Zbog ovih svojstava fenoli iz prirodnih izvora se danas sve češće koriste kao zamjena za sintetske aditive, bilo u svrhu produljenja roka trajanja prehrambenih proizvoda ili sprječavanja oksidativnih promjena.¹²

Pokožica grožđa služi kao zaštita grožđa od fizičkih i klimatskih oštećenja i može se podijeliti u tri sloja: vanjski ili kutikula koji se sastoji od zasićenih i nezasićenih karboksilnih kiselina; srednji ili epidermis, te unutarnji sloj odnosno potkožno tkivo koje sadrži većinu fenolnih spojeva u pokožici. Ispitivanja kemijskog sastava i biološkog potencijala pokožica i sjemenki grožđa su brojna i svi znanstveni radovi ukazuju na potencijal njihove primjene u prehrambenoj industriji.⁷ *Yu i sur.*¹³ u svom istraživanju navode da polifenoli iz pokožice grožđa (crnih i bijelih sorti) sprječavaju oksidaciju lipida u prehrambenim proizvodima, te da djeluju antimikrobno prema brojnim vrstama patogenih bakterija i bakterija kvarenja, kao što su npr. *E. faecalis*, *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *P. fragi*, *Salmonella enteritidis* i *Salmonella typhimurium*. Istraživanje koje su proveli *Corrales i sur.*¹⁴ obuhvaćalo je određivanje sadržaja fenola, antioksidacijskog i antimikrobnog djelovanja ekstrakta pokožice bijelog grožđa sorte *Riesling*. Značajnu antioksidacijsku aktivnost ekstrakata autori pripisuju visokom sadržaju katehina, epikatehina i procijanidina, dok se antimikrobna aktivnost prema Gram-pozitivnim vrstama *S. aureus*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes* i Gram-negativnoj *S. typhimurium* pripisuje velikoj količini kvercetina i njegovih derivata.

*Katalinić i sur.*¹⁵ ispitali su antimikrobnu aktivnost fenolnih ekstrakata pokožice grožđa četrnaest različitih sorti prema najčešćim patogenim bakterijama u hrani. Rezultati istraživanja ukazuju na vrlo dobro antimikrobno djelovanje ekstrakata, a najbolji učinak prema Gram-negativnim bakterijama *Campylobacter* i *Salmonella* pokazali su ekstrakti pokožica bijelog grožđa sorti *Debit*, *Zlatica* i *Kujundžusa*.

*Baiano*¹⁶ je u svom istraživanju analizirala fenolni sastav i antioksidacijsku aktivnost sjemenki i pokožice sedam različitih sorti bijelog i crnog grožđa proizvedenog u Italiji. Rezultati navode da su sjemenke dale veliki doprinos antioksidacijskoj aktivnosti jer su imale veći sadržaj fenola u usporedbi s pokožicama, a kao najdominantniji fenolni spoj navodi se proantocijanidin. *Nirmala i sur.*¹⁷ također navode veći sadržaj fenola i flavonoida te bolju antioksidacijsku i antimikrobnu aktivnost sjemenki crnog grožđa sorte *Muškat crni* u odnosu na pokožicu istog grožđa.

Snažno antimikrobno djelovanje ekstrakata sjemenki crnog grožđa prema Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijskim vrstama, a osobito prema *E.coli* i *P. aeruginosa* ističu *Gupta i sur.*¹⁸ Na dobra antioksidacijska i antimikrobna svojstva sjemenki grožđa ukazuju i *Krasteva i sur.*¹⁹ U jednoj od svojih studija istražili su ukupni sadržaj fenola te antioksidacijsku i antimikrobnu aktivnost ekstrakata sjemenki četiri različite sorte bijelog i crnog grožđa. Najveći udio fenola te najbolja antioksidacijska aktivnost zabilježena je kod sjemenki crnog grožđa sorti *Pinot Noir* i *Marselan*, a najveći antimikrobni učinak prema *S. aureus*. U izdvojenim ekstraktima sjemenki je utvrđen visok sadržaj katehina, epikatehina i procijanidina B1, te se izvodi zaključak o mogućoj primjeni navedenih ekstrakata kao antimikrobnih sredstava u prehrambenoj industriji.

*Katalinić i sur.*²⁰ osim pokožica grožđa, ispitali su kemijski sastav i biološki potencijal ekstrakata lišća vinove loze sakupljenog u različitim vremenskim periodima. Iako je poznato da lišće sadrži fenolne spojeve malo je radova koji istražuju antimikrobnu aktivnost lišća. Autori posebno izdvajaju ekstrakte lišća sakupljene u kolovozu i rujnu koje je imalo najveći udio flavonola i stilbena. Antimikrobna aktivnost ekstrakata lišća ispitana je prema Gram-pozitivnim (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*) i Gram-negativnim bakterijama (*Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* i *Salmonella Infantis*) te je potvrđena dobra aktivnost prema svim testiranim mikroorganizmima, osobito crnih sorti.

Antioksidacijsku i antimikrobnu sposobnost ekstrakata lišća crne vinove loze prema Gram-pozitivnim bakterijama *S. aureus* i *E. faecalis* te prema Gram-negativnim bakterijama *E. coli* i *P. aeruginosa* ispitali su *Ahmad i sur.*²¹ Antimikrobno djelovanje određeno je disk difuzijskom metodom, a najbolji rezultati antimikrobne i antioksidacijske aktivnosti ostvareni su prema *S. aureus* (30 mm).

*Lima i sur.*²² su u svom radu proučavali antioksidacijsko djelovanje deset različitih sorti vinove loze te su došli do zaključka da lišće bijelih sorti vinove loze pokazuje bolji antioksidacijski potencijal. Dakle, iako je manje istražen i iskorišten nusprodukt vinarstva, lišće vinove loze pokazuje dobru antioksidacijsku aktivnost koja je povezana s visokim sadržajem polifenola koji su snažni prirodni antioksidansi.

Broj znanstvenih studija koji proučavaju kemijski sastav i biološka svojstva vinskog taloga je vrlo mal, no sve one koje su dostupne ističu da ovaj nusprodukt vinarstva ima visoki udio fenolnih spojeva i vrlo dobar antioksidacijski i antimikrobni potencijal. *Jara-Palacios*⁹ u svom radu navodi flavonole i antocijane kao najzastupljenije spojeve u talogu crnog grožđa deset različitih sorti vinove loze iz Španjolske. *Nadilo*²³ i *Tadić*²⁴ u svojim završnim radovima ispitali su kemijski sastav i antioksidacijsku aktivnost vinskih taloga bijelog vina sorte *Malvasija dubrovačka* i crnog vina sorte *Plavac mali*, sorti grožđa koje su ujedno predmet istraživanja ovog rada. Najveći udio fenola bio je u talogu crnog vina, a najzastupljeniji fenoli *p*-hidroksibenzojeva kiselina i kvercetin. *Nadilo*²³ u svom radu ističe da je udio *p*-hidroksibenzojeve kiseline i kvercetina u talogu rosé vina 2,5 do 12 puta niži u odnosu na talog crnog vina. Najveću antioksidacijsku aktivnost pokazao je talog crnog vina FRAP i ORAC metodom, dok je DPPH metodom najveću antioksidacijsku aktivnost pokazao talog rosé vina. *Tadić*²⁴ u svom radu ističe da je talog bijelog vina nakon maceracije imao gotovo dvostruko veći udio fenola i dvostruko bolju antioksidacijsku aktivnost u odnosu na talog vina uzorkovan nakon provedene fermentacije.

1.3. Primjena nusproizvoda vinarstva u prehrambenoj industriji

U prethodnom poglavlju izdvojena su istraživanja koja ukazuju na visoku nutritivnu vrijednost i veliki potencijal primjene nusproizvoda vinarstva u prehrambenoj industriji. Njihova primjena uglavnom je osiguravala sigurnost proizvoda, produženje roka trajanja i/ili sprječavanje mikrobnog kvarenja hrane. Osim toga, nusproizvodi imaju dobar okus i atraktivnu boju što olakšava njihovu upotrebu u prehrambenim proizvodima. Visoka koncentracija fenola, koji se mogu ekstrahirati iz nusproizvoda, odgovorna je za antioksidacijsko, antimikrobno, antikancerogeno i protuupalno djelovanje pokožice, komine, sjemenki i lišća vinove loze. Zahvaljujući mnogim zdravstvenim prednostima, ovi nusproizvodi mogu se smatrati prirodnom alternativom tradicionalnim sintetskim dodacima.²⁵

*Katalinić i sur.*²⁰ u studiji o ekstraktima lišća vinove loze ističu da visok sadržaj flavan-3-ola i flavonola, posebice kvercetina i njegovih derivata čine listove vinove loze mogućim, jeftinim izvorom biološki aktivnih polifenolnih smjesa. Visok fenolni potencijal i značajna antioksidacijska i antimikrobna aktivnost lišća vinove loze, osobito lišća bijelog grožđa sorte *Pošip* i crnog grožđa sorte *Merlot* sakupljenog nakon sazrijevanja grožđa otvaraju mogućnosti njegove primjene u sprječavanju oksidativnog propadanja i mikrobnog kvarenja proizvoda. Također, lišće koje ostane na trsu nakon berbe grožđa predstavlja zanimljiv nusproizvod za daljnje korištenje, obzirom da branje lišća ne ometa sazrijevanje i berbu grožđa.

Za razliku od lišća, komina se tradicionalno koristila za dobivanje vinskog alkohola, prehrambenih boja i ulja od sjemenki grožđa. U posljednje vrijeme, istraživanja su usmjerena na proizvodnju drugih proizvoda, kao što su ekstrakti bioaktivnih spojeva, uglavnom fenola i vinske kiseline te proizvodnju brašna od komine grožđa. Proizvodi od vinske komine se najčešće koriste kao antioksidansi, prirodna bojila te kao antimikrobna sredstva. Unatoč navedenim prednostima, primjena nusproizvoda vinifikacije u proizvodnji hrane je još uvijek u fazi razvoja. Dostupna literatura navodi nekoliko proizvoda u kojima se spomenuti nusproizvodi koriste, kao što su npr. mesne i riblje prerađevine ili proizvodi od žitarica, a s ciljem inhibicije oksidacije lipida te poboljšanja senzorskih svojstava, kvalitete i sigurnosti navedenih proizvoda.²⁶

Obogaćivanje hrane nusproizvodima vinarstva pružit će mogućnost razvoja funkcionalnih prehrambenih proizvoda i uvođenje prirodnih funkcionalnih sastojaka poput fenola, u hranu koja se konzumira. Do danas je poznata primjena praha vinske komine kao zamjene za brašno u cilju poboljšanja bioaktivnog potencijala i fizičkih svojstava kruha. Također, tjestenina napravljena s brašnom obogaćenim prahom vinske komine zadržala je antocijane i hidroksitirozol te pokazala dobru teksturu nakon kuhanja. Vinska komina dodana u mliječne proizvode poboljšava mogućnost skladištenja proizvoda, produžuje njihov rok trajanja te smanjuje količinu slobodnih masnih kiselina. Također, dodatak vinske komine kao nusproizvoda može biti alternativa proizvodima bez glutena za poboljšanje njihovih nutritivnih svojstava.²⁷

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Reagensi

Sve kemikalije korištene u ovom radu su od proizvođača Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Njemačka), Fluka (Buchs, Švicarska) ili Kemika (Zagreb, Hrvatska). Hranjive mikrobiološke podloge su od proizvođača Biolife (Milano, Italija).

2.2. Uređaji

U eksperimentalnom dijelu rada korišteni su sljedeći uređaji:

- Uređaj za ultrazvučnu ekstrakciju, Ultrasonic cleaner, Velika Britanija
- Sušionik, Memmert UF30, Njemačka
- Analitička vaga, Kern, Model ALS 120-4, Kingston, Velika Britanija
- Mlinac za kavu, Joy Delimano, Hrvatska
- Termostatska miješalica mikrotitarskih pločica, Plate Shaker-Termostat PST-60 HL, Biosan, Riga, Latvija
- Inkubator, Pol Eko, Smart, Berlin, Njemačka
- Autoklav, Astell AMA440, Kent, Velika Britanija
- Vortex, Phoenix Instruments RS-VA 10, Garbsen, Njemačka
- Denzitometar, DEN-1, Biosan, Riga, Latvija

2.3. Materijal

U eksperimentalnom dijelu ovog rada korištena su dva uzorka vinskog taloga uzorkovana tijekom procesa vinifikacije bijelog grožđa sorte *Malvasija dubrovačka* te dva uzorka vinskog taloga uzorkovanog tijekom procesa vinifikacije crnog grožđa sorte *Plavac mali* (tablica 1). Vinifikacija je provedena u podrumu Srednje škole „Braća Radić“ u Kaštel Štafiliću 2021. godine.

Tablica 1. Oznake uzoraka korištene u eksperimentalnom dijelu rada

Oznaka uzorka	Vrijeme uzorkovanja
Uzorak 1	Talog bijelog vina nastao tijekom 24-satne maceracije masulja prije početka fermentacije
Uzorak 2	Talog bijelog vina uzorkovan nakon završene hladne fermentacije od 20 dana
Uzorak 3	Talog crnog vina uzorkovan nakon prvog pretoka; maceracija 6 dana; alkoholna fermentacija masulja 7 dana; tiho vrenje 2 tjedna
Uzorak 4	Talog rosé vina uzorkovan nakon prvog pretoka; fermentacija 7 dana bez prethodne maceracije; tiho vrenje 2 tjedna

Nakon uzorkovanja, talozi su pohranjeni na -20 °C, potom osušeni do konstantne mase u sušioniku pri 60 °C. Osušeni uzorci su homogenizirani i kao takvi korišteni za pripravu ekstrakta. Vagano je po 2 g pojedinog uzorka u Falcon epruvete i dodano 10 mL 50%-tnog etanola. Ekstrakcija je provedena u ultrazvučnoj kupelji tijekom 1 sata pri 60 °C i 40 kHz. Nakon ekstrakcije uzorci su filtrirani preko naboranog filter papira i dobiveni etanolni ekstrakti čuvani su u hladnjaku do trenutka analize.



Slika 3. Osušeni i homogenizirani uzorci vinskog taloga

2.4. Bakterijske kulture

Za određivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata vinskog taloga korišteni su bakterijski sojevi ATCC (eng. *American Type Culture Collection*): *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29219, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Pseudomonas fragi* ATCC 4973. Bakterijske kulture su prenesene s dubokog hranjivog agara na hranjivi agar i inkubirane u aerobnim uvjetima pri 37 °C. Ovako uzgojeni sojevi su zatim čuvani u hladnjaku pri +4 °C.

2.5. Metode određivanja antimikrobne aktivnosti

Antimikrobna aktivnost ekstrakata vinskog taloga napravljena je metodom određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC)²⁸, metodom određivanja minimalne baktericidne koncentracije (MBC)²⁹ te metodom difuzije u jažicama.²⁹

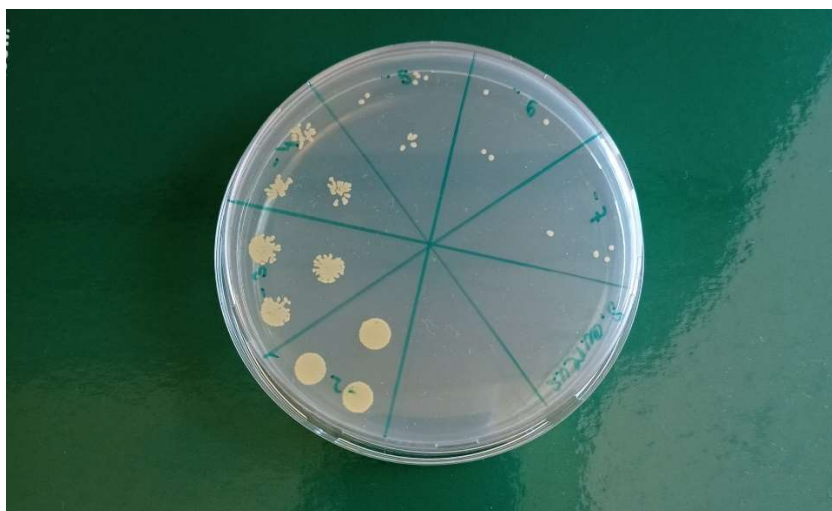
Otopine, posuđe i pribor korišteni tijekom izvedbe eksperimentalnog dijela rada bili su sterilni kao i uvjeti pri kojima se provodio eksperimentalni rad.

2.5.1. Priprema i kontrola inokuluma

Prije početka eksperimenta svaka od bakterijskih kultura je revitalizirana na hranjivom Mueller-Hinton agaru (MHA) i zatim korištena za pripremu inokuluma. Jedna kolonija MHA se uzeta je ezom i prenijeta u 3-5 mL Mueller-Hinton bujona (MHB) kako bi se pripravile prekonocne kulture pri 37 °C, 14 do 16 h. Nakon inkubacije, otpipetirano je 3 mL kulture u 27 mL MHB-a te je smjesa stavljena na inkubaciju tijekom 1-1,5 h pri 37 °C (ovisno o vrsti bakterije), uz konstantno miješanje (110 okretaja po minuti). Gustoća bakterija je očitana pomoću denzitometra te je na osnovu umjerenih krivulja od suspenzije otpipetiran određeni volumen kulture u novu sterilnu posudicu s MHB i pripremljen inokulum s koncentracijom bakterijskih stanica 1×10^5 CFU/mL (engl. *Colony Forming Units*). Ovako pripremljen inokulum korišten je u daljnjim postupcima testiranja antimikrobnog djelovanja ekstrakata.

Kao potvrda koncentracije bakterijskih stanica u inokulumu korištena je metoda po Kochu, pri čemu je pripravljena serija decimalnih razrjeđenja inokuluma u fosfatnom puferu (Phosphate Buffered Saline, PBS). Po 20 µL nakapano je na hranjivu MHA podlogu i stavljeno na inkubaciju pri 37 °C u razdoblju od 24 h. Nakon završene inkubacije izbrojane su narasle kolonije na hranjivoj podlozi te je izračunat broj živih stanica po mililitru uzorka.³⁰

$$\text{CFU / mL} = \frac{\text{broj kolonija} \cdot \text{faktor razrjeđenja}}{\text{volumen uzorka}}$$



Slika 4. Kontrola inokuluma

2.5.2. Metoda određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC metoda)

MIC metoda provodi se korištenjem MHA, koji je najbolji medij za rutinske testove osjetljivosti jer se lako reproducira, ima nizak udio sulfonamida, trimetoprima i tetracikličnih inhibitora i daje zadovoljavajući rast većine patogenih bakterija.³¹

MIC vrijednost je predstavljena kao najniža koncentracija antimikrobnog uzorka koji potpuno inhibira vidljivi rast testiranog mikroorganizma te se izražava u mg suhog ekstrakta/L ekstrakta ili mg GAE (ekvivalenata galne kiseline)/L ekstrakta.^{29,32}

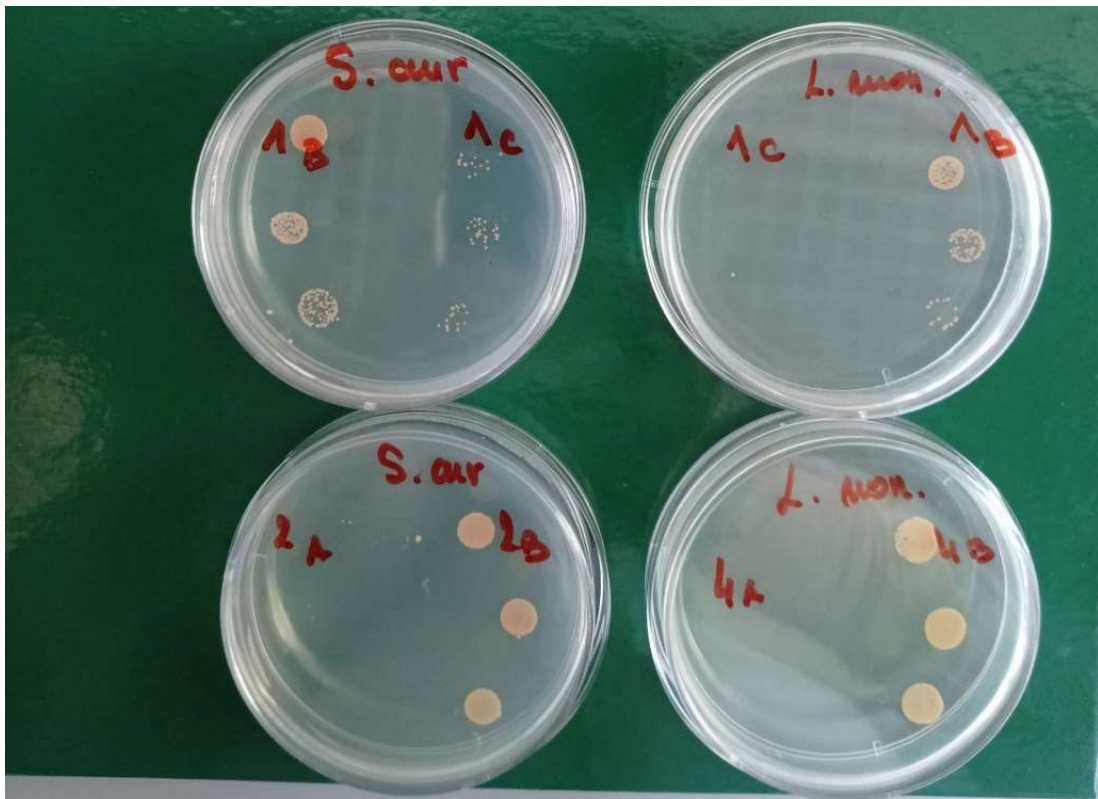
Za određivanje MIC vrijednosti koristila se metoda mikrodilucije, a mikrotitarska pločica s 96 otvora koja se koristila prikazana je na slici 5. Testirani uzorak ekstrakta vinskog taloga serijski je razrijeđen duž mikrotitarske pločice tako što je 50 μ L uzorka prenijeto u sljedeći otvor na pločici, koji je sadržavao 50 μ L MHB-a te izmiješano. Volumen od 50 μ L novog razrjeđenja je istim postupkom prenesen u sljedeći otvor na pločici i postupak je ponavljan sve do kraja mikrotitarske pločice. Konačni volumen u svakom otvoru nakon razrjeđivanja bio je 50 μ L. U svrhu kontrole rezultata na svakoj pločici pripravljena je slijepa proba (100 μ L MHB), pozitivna kontrola (50 μ L MHB + 50 μ L ekstrakta vinskog taloga) i negativna kontrola za svaki uzorak (50 μ L MHB + 50 μ L ekstrakta vinskog taloga). Nakon toga, u sve otvore mikrotitarske pločice, osim u slijepu probu i negativne kontrole je dodano 50 μ L pripremljenog inokuluma.²⁶ Potom su suspenzije izmiješane na tresilici i inkubirane 24 h pri 37 °C. Nakon 24-satne inkubacije u svaki je otvor mikrotitarske pločice dodano po 10 μ L indikatora INT (2 mg/mL) te su pločice stavljene na inkubaciju pri 37 °C još 1 h. Rezultati su vizualno očitavani promatranjem promjene boje na pločici usporedbom boje pozitivne kontrole, slijepa probe i negativne kontrole s obojenjima u otvorima u kojima se nalaze testirani ekstrakti.^{29,33}



Slika 5. Mikrotitarske pločice pri određivanju MIC vrijednosti

2.5.3. Metoda određivanja minimalne baktericidne koncentracije (MBC metoda)

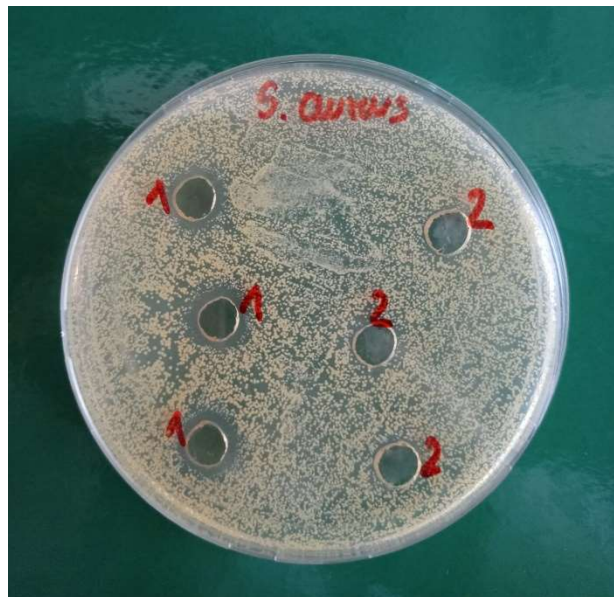
MBC vrijednost, odnosno minimalna baktericidna koncentracija je najniža koncentracija antimikrobnog sredstva potrebna za uništavanje 99,9% inokuluma nakon inkubacije od 24 h pri standardnim uvjetima. MBC se može odrediti nakon dilucije u bujonu ili u agaru i najčešće predstavlja procjenu baktericidne ili fungicidne aktivnosti nekog uzorka.^{29,34} Postupak je proveden tako da su uzorci iz mikrotitarske pločice, za koje je utvrđeno da predstavljaju MIC vrijednosti, prenijeti na neselektivne agar pločice (MHA) i stavljeni na inkubaciju tijekom 24 h. Nakon inkubacije je određen broj preživjelih stanica mikroorganizma (CFU/mL) i na taj način je određena MBC vrijednost za svaki pojedini mikroorganizam. Primjeri agar pločica nakon inkubacije prikazani su na slici 6.



Slika 6. Agar pločice nakon 24-satne inkubacije

2.5.4. Metoda difuzije u jažicama

Cilj metode difuzije u jažicama je odrediti inhibiciju rasta bakterija oko izbušenih rupica na hranjivoj podlozi u kojima se nalazi određena koncentracija ekstrakta. Međutim, bakterijska inhibicija rasta ne znači bakterijsku smrt te stoga ova metoda ne razlikuje baktericidno i bakteriostatsko djelovanje. Metoda se izvodi u Petrijevim zdjelicama na čvrstoj hranjivoj MHA podlozi. Bakterijske kulture su nakon nanošenja razmazom na hranjivu podlogu Petrijeve zdjelice ostavljene 2-3 minute da se osuše i nakon sušenja u agaru su izbušene rupice (jažice) promjera 7-8 mm. Potom je u svaku jažicu dodano po 50 μ L ispitivanog ekstrakta, nakon čega su Petrijeve zdjelice stavljene u hladnjak na sat vremena kako bi aktivne komponente ekstrakta difundirale u hranjivu podlogu. Nakon toga je napravljena inkubacija u trajanju od 20-24 sata pri temperaturi 37 °C, i izmjerene su zone inhibicije bakterijskog rasta oko jažice.²⁹ Zona inhibicije \geq 12 mm predstavlja dobar inhibitorski učinak ekstrakta vinskog taloga.³⁵



Slika 7. Inhibicija rasta bakterije *S.aureus* određena metodom difuzije u jažicama

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Rezultati određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i minimalne baktericidne koncentracije (MBC)

Cilj ovog rada bio je odrediti antimikrobnu aktivnost ekstrakata nusproizvoda vinifikacije prema patogenim bakterijama i bakterijama kvarenja koje se mogu pronaći u hrani korištenjem različitih metoda određivanja antimikrobnog učinka. Osim toga, cilj je također bio i donijeti zaključak o mogućnosti primjene nusproizvoda zaostalih nakon vinifikacije kao konzervansa u prehrambenoj industriji.

Dobiveni rezultati antimikrobne aktivnosti ekstrakata nusproizvoda vinifikacije bijelog vina sorte *Malvasija dubrovačka* te crnog i rosé vina sorte *Plavac mali* prikazani su u tablicama 2 i 3 te na slici 8.

Tablica 2. MIC i MBC vrijednosti taloga vina izražene u mg GAE/L za patogene bakterije

Oznaka uzorka	<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Uzorak 1	50,9	50,9	50,9	50,9	50,9	50,9	50,9	101,8
Uzorak 2	131,0	131,0	65,5	65,5	65,5	65,5	131,0	131,0
Uzorak 3	211,9	423,8	105,9	105,9	211,9	211,9	211,9	211,9
Uzorak 4	129,4	129,4	129,4	129,4	64,7	64,7	129,4	129,4

Tablica 3. MIC i MBC vrijednosti taloga vina izražene u mg GAE/L za bakterije kvarenja

Oznaka uzorka	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Pseudomonas fragi</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC
Uzorak 1	25,5	25,5	25,5	25,5
Uzorak 2	32,7	32,7	65,5	65,5
Uzorak 3	105,9	105,9	105,9	105,9
Uzorak 4	32,3	32,3	32,3	32,3

U tablicama 2 i 3 prikazane su MIC i MBC vrijednosti ekstrakata vinskih taloga prema najčešćim patogenim bakterijama i bakterijama kvarenja. Budući da MIC vrijednosti predstavljaju minimalnu koncentraciju nekog uzorka koja može inhibirati rast i razmnožavanje bakterija, bolji učinak su predstavljale niže vrijednosti u usporedbi s višim vrijednostima prikazanim u tablicama. Od svih navedenih ekstrakata najniže MIC vrijednosti, što ujedno znači i najbolji antimikrobni učinak, pokazao je uzorak bijelog vina dobiven maceracijom masulja u razdoblju od 24 h prije početka fermentacije (uzorak 1) prema bakterijama kvarenja (MIC vrijednost 25,5 mg GAE/L) i patogenim bakterijama (50,9 mg GAE/L), dok je najveće MIC vrijednosti pokazao uzorak crnog vina (uzorak 3), uzorkovan nakon prvog pretoka, prema patogenim bakterijama (MIC vrijednost 211,9 mg GAE/L) i bakterijama kvarenja (105,9 mg GAE/L). Niže vrijednosti MBC, baš poput MIC vrijednosti, imao je uzorak 1 prema bakterijama kvarenja (MBC vrijednost 25,5 mg GAE/L), dok je najveću vrijednost pokazao uzorak crnog vina prema bakteriji *L. monocytogenes* (MBC vrijednost 423,8 mg GAE/L). U odnosu na talog crnog vina, talog rosé vina imao je dva puta slabiju aktivnost prema *S. aureus*, *L. monocytogenes* i *E. coli*, odnosno četiri puta slabiju aktivnost prema *E. faecalis* i bakterijama kvarenja.

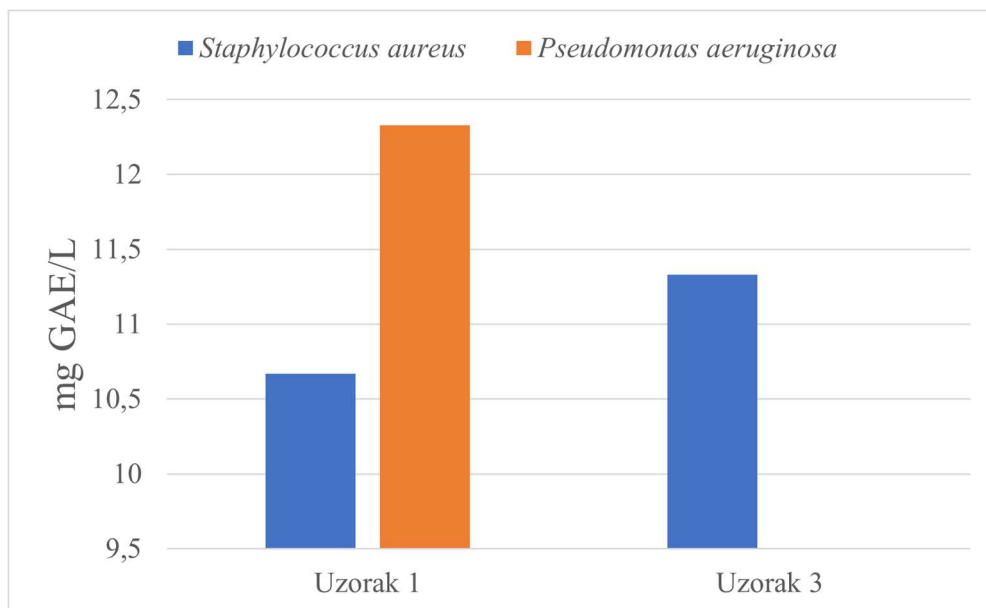
Zanimljivo je da su uzorci taloga dobiveni iz crnih vina pokazali nešto slabiji učinak u odnosu na taloge bijelih vina, osobito u odnosu na uzorak 1. Usporedbom aktivnosti uzoraka 1 i 2 vidljivo je da uzorak 2, odnosno talog bijelog vina uzorkovan nakon završene hladne fermentacije pokazuje dvostruko slabiju aktivnost u odnosu na uzorak 1.

Također, može se uočiti i bolji učinak ispitivanih ekstrakata prema bakterijama kvarenja u odnosu na testirane patogene bakterije. Svi testirani uzorci imali su isti ili bolji učinak prema Gram-negativnoj vrsti bakterije *E. coli* u odnosu na ostale Gram-pozitivne vrste. Obzirom na jednostavniju građu stanične membrane očekivano je da će ispitivani uzorci bolje djelovati prema Gram-pozitivnim bakterijama. Tome u prilog ide i istraživanje koje su proveli *Durante i sur.*³⁶ Autori su ispitivali antibakterijsko djelovanje ekstrakta vinskog taloga bijelog i crnog grožđa dviju različitih sorti grožđa iz Portugala na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije te su ustanovili da ekstrakti taloga crnog vina imaju bolji učinak prema Gram-pozitivnim bakterijama, a najniža MIC vrijednost je dobivena prema *S. aureus*. MIC vrijednosti im se kreću u rasponu od 2,5 za *S. aureus* do 10 mg/mL za *P. aeruginosa* kod crnih vina te >10 mg/mL kod bijelih vina. Zanimljivo je da su ekstrakti taloga crnog i bijelog vina inhibirali rast svih testiranih bakterija: *E. coli*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa* i *E. faecalis*.

Međutim, u našem slučaju dodatna vanjska membrana koju posjeduju Gram-negativne bakterije nije utjecala na lošiji rezultat. Može se pretpostaviti da kemijski sastav i prisutnost pojedinih fenola doprinosi boljem učinku ekstrakata prema Gram-negativnim vrstama bakterija. Ovoj pretpostavci ide u prilog i istraživanje *Gupta i sur.*¹⁸ koji ističu da pokožica i sjemenke grožđa snažno djeluju na Gram-negativne bakterije zbog prisutnosti resveratrola koji potiče oksidativno oštećenje bakterijske membrane bez utjecaja na stanice domaćina, a svi ekstrakti testirani u ovom radu sadržavali su resveratrol, što je potvrđeno u završnim radovima *Nadilo i Tadić*^{23,24}.

3.2. Rezultati određivanja antimikrobne aktivnosti metodom difuzije u jažicama

Rezultati metode difuzije u jažicama prikazani su na slici 8. Grafički su prikazani samo rezultati djelovanja uzorka 1 i 3 prema bakterijama *P. aeruginosa* i *S. aureus*, obzirom da ostali uzorci nisu pokazali djelovanje prema testiranim bakterijskim vrstama.



Slika 8. Prikaz zona inhibicije (mm) prema bakterijama *P. aeruginosa* i *S. aureus*

Može se uočiti kako je uzorak 1 pokazao najbolju aktivnost prema bakteriji kvarenja *P. aeruginosa* (zona inhibicije 12,33) i *S. aureus* (zona inhibicije 10,67), a uzorak 3 ili talog crnog vina prema *S. aureus* (zona inhibicije 11,33). Ostali uzorci nisu pokazali inhibitorni učinak niti prema testiranim patogenim bakterijama niti prema bakterijama kvarenja, no kako nema dostupnih literaturnih podataka o djelovanju taloga bijelog i crnog vina na navedene bakterije ne možemo zaključiti je li rezultat bio očekivan.

4. ZAKLJUČCI

Na osnovu provedenog istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

- Analizirani ekstrakti su pokazali dobru antimikrobnu aktivnost određenu MIC i MBC metodama osobito prema Gram-negativnim bakterijskim vrstama.
- Od analiziranih ekstrakata najniže MIC i MBC vrijednosti pokazao je talog bijelog vina uzorkovan tijekom 24-satne maceracije masulja prije početka fermentacije i to prema *P. aeruginosa* i *P. fragi*.
- Od crnih vina najniže MIC i MBC vrijednosti pokazao je talog rosé vina također prema bakterijama kvarenja (*P. aeruginosa* i *P. fragi*).
- Metodom difuzije u jažicama najbolji inhibitorni učinak pokazao je talog bijelog vina dobiven tijekom 24-satne maceracije masulja prije početka fermentacije prema Gram-negativnoj bakteriji *P. aeruginosa*, a talog crnog vina je pokazao najbolji učinak prema Gram-pozitivnoj bakteriji *S. aureus*.
- Zbog dobre antimikrobne aktivnosti vinski talog bijelog i crnog vina ima veliki potencijal primjene kao konzervans u prehrambenoj industriji, no potrebna su dodatna istraživanja.

5. LITERATURA

1. Zakon o vinu, NN 96/2003, Hrvatski sabor, članak 2.,2005. URL: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2003_06_96_1219.html (5. 4. 2023.).
2. URL: <https://vinarija.com/184-temeljne-podjele-vina> (5. 4. 2023.)
3. URL: <https://svijetlidvori.hr/sastav-vina/> (5. 4. 2023.)
4. Ž. Skračić, I. Ljubenković, N. Mimica, I. Generalić Mekinić, Valorizacija nusproizvoda proizvodnje vina, *Kem. Ind.* **72** (3-4) (2023), str. 247–255, doi: 10.15255/KUI.2022.051.
5. M. Perra, G. Bacchetta, A. Muntoni, G. De Gioannis, I. Castangia, H. N. Rajha, M. L. Manca, M. Manconi, An outlook on modern and sustainable approaches to the management of grape pomace by integrating green processes, biotechnologies and advanced biomedical approaches, *J. Func. Foods*, Vol. **98**, (2022), 105276, doi: 10.1016/j.jff.2022.105276.
6. URL: <https://bs.healthy-food-near-me.com/how-to-make-chacha-from-grape-pomace-at-home> (3. 5. 2023.)
7. M. Spinei, M. Oroian, The Potential of Grape Pomace Varieties as a Dietary Source of Pectic Substances, *Foods* (2021), **10**(4), 867, doi: 10.3390/foods10040867.
8. M. Blackford, M. Comby, L. Zeng, A. Dienes-Nagy, G. Bourdin, F. Lorenzini, B. Bach, A review on Stems Composition and Their Impact on Wine Quality, *Mol.* (2021), **26**(5), 1240, doi: 10.3390/molecules26051240.
9. M. J. Jose-Palacios, Wine Lees as a Source of Antioxidant Compounds, *Antiox.* (2019), **8**(2), 45, doi: 10.3390/antiox8020045.
10. A. Sabra, T. Netticadan, C. Wijekoon, Grape bioactive molecules, and the potential health benefits in reducing the risk of heart diseases, *Food Chem.* (2021), Vol. **12**, 100149, doi: 10.1016/j.fochx.2021.100149.
11. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Quercetin#section=2D-Structure> (3. 5. 2023.)
12. Y. Xu, S. Burton, C. Kim, E. Sismour, Phenolic Compounds, antioxidant, and antibacterial properties of pomace extracts from four Virginia-grown grape varieties, *Food Sci.&Nutr.* (2015) Aug 7; **4**(1): str.125-33, doi: 10.1002/fsn3.264.
13. J. Yu, M. Ahmedna, Functional components of grape pomace: Their composition, biological properties and potential applications, *International Jour. Food Sc.&Techn.* **48**(2), (2012), doi: 10.1111/j.1365-2621.2012.03197.x.

14. M. Corrales, A. Fernandez, M. G. Vizoso Pinto, P. Butz, C. M.A.P. Franz, E. Schuele, B. Tauscher, Characterization of phenolic content, in vitro biological activity, and pesticide loads of extracts from white grape skins from organic and conventional cultivars, *Food Chem. Tox.* (2010), Vol. **48**, str. 3471-3476, doi: 10.1016/j.fct.2010.09.025.
15. V. Katalinić, S. Smole Možina, D. Skroza, I. Generalić, H. Abramovič, M. Miloš, I. Ljubenković, S. Piskernik, I. Pezo, P. Terpinč, M. Boban, Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia), *Food chemistry*, **119**, (2010), str. 715-723, doi: 10.1016/j.foodchem.2009.07.019.
16. A. Baiano, Varietal Differences among the Phenolic Profiles and Antioxidant Activities of Seven Table Grape Cultivars Grown in the South of Italy Based on Chemometrics, *J. Agric. Food Chem.* 2011, **59**(18), 9815-9826, doi: 10.1021/jf203003c
17. J. G. Nirmala, R. T. Narendhirakannan, In vitro antioxidant and antimicrobial activities of grapes (*Vitis vinifera*. L) seed and skin extracts – Muscat variety, (2011), **3**(4): 242-249.
18. M. Gupta, S. Dey, D. Marbaniang, P. Pal, S. Ray, B. Mazumder, Grape seed extract: having a potential health benefits, *Jour. Food Sc.&Techn.* **57**, (2020), str. 1205-1215, doi: 10.1007/s13197-019-04113-w.
19. D. Krasteva, Y. Ivanov, Z. Chengolova, T. Godjevaegova, Antimicrobial Potential, Antioxidant Activity, and Phenolic Content of Grape Seed Extracts from Four Grape Varieties, *Microorg* (2023), **11**(2), 395, doi: 10.3390/microorganisms11020395.
20. V. Katalinić, S. Smole Možina, I. Generalić, D. Skroza, I. Ljubenković, A. Klančič, Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of leaf extracts from six *Vitis vinifera* L. varieties, *Interational Jour. Food Prop.* **16**, (2013), str. 45-60, doi: 10.1080/10942912.2010.526274.
21. W. Ahmad, M. Ilyas Khan, M. Waqar, M. A. Khan, A. Khan, R. Ramazan, S. Wali, F. Ahmad, N. Khan, S. Yousaf, M. Zeb, A. U. Khan, M. U. Rahman, S. Faisal, In vitro Antibacterial Activity of *Vitis vinifera* Leaf against some Pathogenic Bacterial Strains, *Adv. Bio. Res.* (2014), **8**(2), 62-67, doi: 10.5829/idosi.abr.2014.8.2.82348.
22. A. Lima, A. Bento, I. Baraldi, R. Malheiro, Selection of grapevine leaf varieties for culinary process based on phytochemical composition and antioxidant properties, *Food Chem.* (2016), 212, str. 291-295, doi: 10.1016/j.foodchem.2016.05.177.

23. *A. Nadilo*, Fenolni profil i biološki potencijal nusproizvoda vinifikacije crnog i rosé vina. Završni rad, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, 2022.
24. *A. Tadić*, Fenolni profil i biološki potencijal nusproizvoda vinifikacije bijelog vina. Završni rad, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, 2022.
25. URL: <https://www.news-medical.net/news/20221024/What-are-the-health-benefits-and-food-industry-applications-of-wine-industry-by-products.aspx> (5. 5. 2023.)
26. *J. Garcia-Lomillo, M. L. Gonzales-SanJose*, Applications of Wine Pomace in the Food Industry: Approaches and Functions, **16**, (2018), Comprehensive Rev. in Food Sc.& Food Safety, str. 3-22. doi: 10.1111/1541-4337.12238.
27. *R. Ferrer-Gallego, P. Silva*, The Wine Industry By-Products: Applications for Food Industry and Health Benefits, *Antiox.* (2022), **11**(10), 2025, doi: 10.3390/antiox11102025.
28. *A. Klančnik, S. Piskernik, B. Jeršek, S. Smole Možina*, Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts, *J. Microbiol. Methods.* (2010); **81**, str. 121-126. doi: 10.1016/j.mimet.2010.02.004.
29. *M. Balouir, M. Sadiki, S. K. Ibnsouda*, Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J. Pharm. Anal.* (2016); **6**(2), str.71-79, doi: 10.1016/j.jpha.2015.11.005.
30. *M. Ivančić, G. Kovač*, Sinteza, konformacijska analiza i biološka evaluacija tripeptida izvedenih iz ferocen-1,1'-diamina s Ala-Pro sekvencom. Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, 2021, str. 32-33.
31. *L. Ruangpan*, Minimal inhibitory concentration (MIC) test and determination of antimicrobial resistant bacteria, In Laboratory manual of standardized methods for antimicrobial sensitivity tests for bacteria isolated from aquatic animals and environment 2004: str. 31-55.
32. *K. Wiegand Hilpert, Hancock R. E. W.* Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) od antimicrobial substances, *Nat. Protoc.* (2008); **3**(2) str. 163-175. doi: 10.1038/nprot.2007.521.
33. *D. Skroza*, Učinak odabranih fenolnih spojeva na antioksidacijsku i antimikrobnu aktivnost resveatrola u binarnim fenolnim smjesama. Doktorska disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb; 2015.
34. *C. Owuama*, Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) using a novel dilution tube method, *Afr. J. of Microbiol. Res.* (2017); **11**(23) str. 977-980. doi: 10.5897/AJMR2017.8545.

35. *H. Koohsari, E.A. Ghaemi, M.S. Shesh Poli, A. Sadegh*, Evaluation of antibacterial activity of Lemon verbena (*Lippiacitriodora*) leaves, Ascholars Research Library. USA; 2013. Dostupno na: www.scholarsresearchlibrary.com (17. 5. 2023.)
36. *C. N. Duarte, O. Taofiq, M.I. Dias, S. A. Heleno, C. Santos-Buelga, L. Barros, J. S. Amaral*, Chemical Characterization and Bioactive Properties of Wine Lees and Diatomaceous Earth towards the Valorization of Underexploited Residues as Potential Cosmeceuticals, *Cosmetics* (2023), **10**(2), 58, doi: 10.3390/cosmetics10020058.