

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

ANTIMIKROBNA AKTIVNOST VINA NA PATOGENE
UZROČNIKE KVARENJA HRANE

ZAVRŠNI RAD

ANĐELA DUGANDŽIĆ

Matični broj: 3

Split, rujan 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENA
TEHNOLOGIJA

ANTIMIKROBNA AKTIVNOST VINA NA PATOGENE
UZROČNIKE KVARENJA HRANE

ZAVRŠNI RAD

ANĐELA DUGANDŽIĆ

Matični broj: 3

Split, rujan 2018.

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

**ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF WINE AGAINST FOOD
BORNE PATHOGENS**

BACHELOR THESIS

ANĐELA DUGANDŽIĆ

Parent number: 3

Split, September 2018.

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

Tema rada: je prihvaćena na 3. Sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta

Mentor: Doc. dr. sc. Danijela Skroza

Pomoć pri izradi: Izv. prof. dr. sc. Vida Šimat

ANTIMIKROBNA AKTIVNOST VINA NA PATOGENE UZROČNIKE KVARENJA HRANE

Anđela Dugandžić, 3

Sažetak:

Rezultati brojnih studija i istraživanja pokazuju kako konzumacija umjerenih količina vina ima povoljan učinak za ljudsko zdravlje. Glavne komponente vina su voda, etanol, glicerol, organske kiseline i fenolni spojevi. Upravo je zbog ovakvog kemijskog sastava dokazano kako vino ima antimikrobne učinke prema nizu patogena koji mogu uzrokovati kvarenje hrane. Zajedno sa alkoholom, fenolni spojevi se smatraju najzaslužnijima za takva svojstva vina.

Zbog specifičnog kemijskog sastava i bioloških svojstava u ovom radu je ispitana antimikrobna aktivnost vina na patogene uzročnike kvarenja hrane. Analiza je provedena na dva crna i tri bijela vina vinarija Volarević (Metković) i Krauthaker (Kutjevo), i to prema Gram pozitivnim (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* i *Listeria monocytogenes*) i Gram negativnim (*Salmonella enterica* i *Escherichia coli*) bakterijama. Analize su provedene korištenjem tri različite metode: metodom određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC), metodom difuzije u jažicama (engl. Well diffusion method) i disk difuzijskom metodom.

Dobiveni rezultati ukazuju na bolju antimikrobnu aktivnost vina određenu MIC metodom prema Gram pozitivnim bakterijskim vrstama u odnosu na Gram negativne. Najniže MIC vrijednosti pokazali su Plavac mali standardni prema *S. aureus* i Graševina standardna prema *L. monocytogenes*, dok disk difuzijskom metodom nije dokazan inhibitorni učinak vina. Najbolji inhibitorni učinak određen metodom difuzije u jažicama pokazao je Plavac mali standardni i to prema *S. aureus* i *E. coli*.

Ključne riječi: vino, fenolni spojevi, resveratrol, antioksidansi, antimikrobna aktivnost

Rad sadrži: 34 stranice, 12 slika, 9 tablica, 37 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Doc. dr. sc. Ivana Generalić-Mekinić, predsjednik
2. Doc. dr. sc. Miće Jakić, član
3. Doc. dr. sc. Danijela Skroza, mentor

Datum obrane: 17. rujna 2018. g.

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 33

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Food Technology

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food Technology

Thesis subject: was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session No. 3

Mentor: Ph. D. Danijela Skroza, Assistant Professor

Technical assistance: Ph. D. Vida Šimat, Associate Professor

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF WINE AGAINST FOOD BORNE PATHOGENS

Andela Dugandžić, 3

Abstract:

The results of numerous studies and researches show that wine consumption has beneficial effect on human health. The main components of the wine are water, ethanol, glycerol, organic acids and phenolic compounds. Precisely because of the chemical composition it has been proven that wine has antimicrobial effects against number of pathogens that can cause food spoilage. Along with alcohol, phenolic compounds are considered as the most responsible for such wine characteristics.

Due to the specific chemical composition and biological properties of wine, this study aimed to investigate the antimicrobial activity of the wine against pathogenic microorganisms that causes food spoilage. The analysis was carried out on two red and three white wines from the wineries Volarević (Metković) and Krauhter (Kutjevo), against Gram positive (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Listeria monocytogenes*) and Gram negative (*Salmonella enterica* i *Escherichia coli*) bacterial species. The analyses were carried out using three different methods: minimum inhibitory concentration method (MIC), disc diffusion and well diffusion method.

The obtained results indicate a better antimicrobial activity of wine to Gram positive bacterial species in comparison to Gram negative determined by the MIC method. The lowest MIC values show a standard Plavac mali against *S. aureus* and standard Graševina against *L. monocytogenes*, while the disc diffusion method has not shown the inhibitory effect of the wine. The most prominent inhibitory effect determined by the well diffusion method was showed standard Plavac mali against *S. aureus* and *E. coli*.

Keywords: wine, phenolic compounds, resveratrol, antioxidants, antimicrobial activity

Thesis contains: 34 pages, 12 figures, 9 tables, 37 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Ph. D. Ivana Generalić-Mekinić, Assistant Professor
2. Ph. D. Miće Jakić, Assistant Professor
3. Ph. D. Danijela Skroza, Assistant Professor

Defence date: 17th September 2018.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 33.

Završni rad je izrađen u Zavodu za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu i u Laboratoriju medicinske mikrobiologije i parazitologije, Medicinskog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Danijele Skroza, u razdoblju od veljače do rujna 2018. godine.

Ovaj rad je sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2013-11-8652.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

- Ispitati antimikrobnu aktivnost vina Plavac mali (dva uzorka) i Graševine (tri uzorka) na patogene uzročnike kvarenja hrane, odnosno Gram pozitivne: *Staphylococcus Aureus*, *Enterococcus faecelis*, *Listeria monocytogenese* i Gram: negativne *Salmonella enterica* i *Escherichia coli*.
- Antimikrobnu aktivnost odrediti korištenjem triju različitih metoda: metodom određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC); metodom difuzije u jažicama i disk difuzijskom metodom.
- Analizirati dobivene rezultate te donijeti zaključke o antimikrobnoj aktivnosti ispitanih vina.
- Odrediti utjecaj trajanja vinifikacije i sorte na antimikrobnu aktivnost ispitivanih uzoraka.

SAŽETAK:

Rezultati brojnih studija i istraživanja pokazuju kako konzumacija umjerenih količina vina ima povoljan učinak za ljudsko zdravlje. Glavne komponente vina su voda, etanol, glicerol, organske kiseline i fenolni spojevi. Upravo zbog ovakvog kemijskog sastava dokazano je kako vino ima antimikrobne učinke prema nizu patogena koji mogu uzrokovati kvarenje hrane. Zajedno sa alkoholom, fenolni spojevi se smatraju najzaslužnijima za takva svojstva vina.

Zbog specifičnog kemijskog sastava i bioloških svojstava u ovom radu je ispitana antimikrobna aktivnost vina na patogene uzročnike kvarenja hrane. Analiza je provedena na dva crna i tri bijela vina vinarija Volarević (Metković) i Krauthaker (Kutjevo), i to prema Gram pozitivnim (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* i *Listeria monocytogenes*) i Gram negativnim (*Salmonella enterica* i *Escherichia coli*) bakterijama. Analize su provedene korištenjem tri različite metode: metodom određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC), metodom difuzije u jažicama (engl. Well diffusion method) i disk difuzijskom metodom.

Dobiveni rezultati ukazuju na bolju antimikrobnu aktivnost vina određenu MIC metodom prema Gram pozitivnim bakterijskim vrstama u odnosu na Gram negativne. Najniže MIC vrijednosti pokazali su Plavac mali standardni prema *S. aureus* i Graševina standardna prema *L. monocytogenes*, dok disk difuzijskom metodom nije dokazan inhibitorni učinak vina. Najbolji inhibitorni učinak određen metodom difuzije u jažicama pokazao je Plavac mali standardni i to prema *S. aureus* i *E. coli*.

Ključne riječi: vino, fenolni spojevi, antioksidansi, antimikrobna aktivnost

SUMMARY:

The results of numerous studies and researches show that wine consumption has beneficial effect on human health. The main components of the wine are water, ethanol, glycerol, organic acids and phenolic compounds. Precisely because of the chemical composition it has been proven that wine has antimicrobial effects against number of pathogens that can cause food spoilage. Along with alcohol, phenolic compounds are considered as the most responsible for such wine characteristics.

Due to the specific chemical composition and biological properties of wine, this study aimed to investigate the antimicrobial activity of the wine against pathogenic microorganisms that causes food spoilage. The analysis was carried out on two red and three white wines from the wineries Volarević (Metković) and Krauhter (Kutjevo), against Gram positive (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Listeria monocytogenes*) and Gram negative (*Salmonella enterica* i *Escherichia coli*) bacterial species. The analyses were carried out using three different methods: minimum inhibitory concentration method (MIC), disc diffusion and well diffusion method.

The obtained results indicate a better antimicrobial activity of wine to Gram positive bacterial species in comparison to Gram negative determined by the MIC method. The lowest MIC values show a standard Plavac mali against *S. aureus* and standard Graševina against *L. monocytogenes*, while the disc diffusion method has not shown the inhibitory effect of the wine. The most prominent inhibitory effect determined by the well diffusion method was showed standard Plavac mali against *S. aureus* and *E. coli*.

Keywords: wine, phenolic compounds, resveratrol, antioxidants, antimicrobial activity

SADRŽAJ

UVOD	1
1. OPĆI DIO	2
1.1. Fenolni spojevi u vinu	2
1.2. Flavonoidi	3
1.3. Neflavonoidi.....	5
1.4. Stilbeni	6
1.5. Utjecaj postupka vinifikacije na sadržaj fenola	6
1.5.1. Ekstrakcija fenolnih spojeva tijekom procesa vinifikacije	8
1.6. Biološka aktivnost vina	9
1.6.1. Antioksidacijska aktivnost.....	10
1.6.2. Antimikrobna aktivnost	10
1.6.2.1. Patogeni uzročnici kvarenja hrane.....	11
2. EKSPERIMENTALNI DIO	14
2.1. Materijal	14
2.1.1. <i>Plavac mali crni</i>	14
2.1.2. Graševina	15
2.2. Reagensi korištene za određivanje antimikrobne aktivnosti.....	16
2.3. Bakterijske kulture	17
2.4. Kontrola inokuluma	17
2.5. Metode određivanja antimikrobne aktivnosti	18
2.5.1. Metoda određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC).....	19
2.5.2. Disk difuzijska metoda	19
2.5.3. Metoda difuzije u jažicama.....	21
3. REZULTATI	22
3.1. Rezultati određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC)	22
3.2. Rezultati određivanja antimikrobne aktivnosti metodom difuzije u jažicama .	25
3.3. Rezultati određivanja antimikrobne aktivnosti disk difuzijskom metodom.....	26
4. RASPRAVA.....	27
5. ZAKLJUČAK.....	30
6. LITERATURA	31

UVOD

Vino predstavlja prehrambeni proizvod dobiven potpunom ili djelomičnom alkoholnom fermentacijom mošta ili masulja, odnosno transformacijom prisutnih šećera u alkohol i ugljikov dioksid pomoću kvasaca. Najvažniji sastojci grožđa kao što su šećeri, kiseline, fenolni spojevi, aminokiseline i ioni metala u uvjetima fermentacije stvaraju kompleksan sastav vina koji sadrži i na desetke tisuća različitih kemijskih spojeva u međusobno različitim omjerima. Među navedenim sastojcima grožđa, a u konačnici i vina, posebno se ističu fenoli, spojevi koji se najvećim dijelom smatraju odgovorni za pozitivne učinke vina na ljudsko zdravlje. Brojna istraživanja su pokazala kako konzumacija vina u umjerenim količinama utječe na zaštitu srca i kardiovaskularnog sustava, a kao najzaslužniji spoj za takvo djelovanje spominje se resveratrol.

Među brojnim biološkim učincima vina, osim antioksidacijskog djelovanja, posebno se ističe i antimikrobno djelovanje. Iako se antimikrobni učinci vina stalno istražuju, točni mehanizmi djelovanja fenolnih spojeva na mikroorganizme još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. Brojne studije pokazale su dobru antimikrobnu aktivnost i bijelih i crnih vina, no isto tako ukazala na postojanje razlike u njihovom djelovanju ovisno o profilu i udjelu fenolnih spojeva prisutnih u njima. Stoga je cilj ovog rada bio ispitati antimikrobnu aktivnost crnih i bijelih vina na odabrane patogene uzročnike kvarenja hrane korištenjem tri različite metode: metodom određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC), metodom difuzije u jažicama te disk difuzijskom metodom.

1. OPĆI DIO

1.1. Fenolni spojevi u vinu

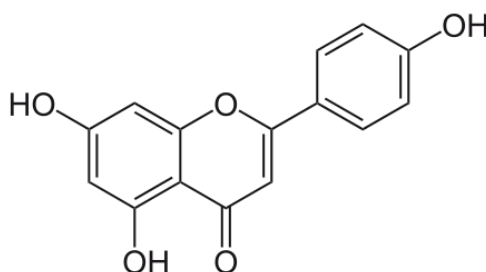
Fenolni spojevi predstavljaju složenu skupinu kemijskih spojeva koje pronalazimo kao glavne sastojke u crnim i bijelim vinima. Osim što utječu na kvalitetu i boju vina, blagotvornim učincima pozitivno djeluju i na ljudsko zdravlje (1). Kemijski ih definiramo kao aromatske organske spojeve, odnosno derivate benzena u čijem prstenu je jedan ili više vodikovih atoma zamijenjeno OH skupinom (2). Međusobnim povezivanjem fenola nastaju složenije komponente koje vinu, osim boje, daju trpak i oporan okus te utječu na njegova senzorna svojstva i stabilnost (3). Fenoli su odgovorni za boju crnih vina dok se u bijelim vinima, obzirom na način njihove proizvodnje, nalaze u puno nižoj koncentraciji. Sastav fenola u vinima ovisi o sorti grožđa, načinu proizvodnje i kemijskim reakcijama koje se događaju tijekom procesa dozrijevanja i starenja vina. Neki fenoli mogu nastati modifikacijom kvasaca, a neki tijekom procesa dozrijevanja uslijed dodira drvenih bačvi i vina, kao što su tanini (4).

Tablica 1. Sadržaj ukupnih fenola u pojedinim dijelovima grozda izražen u mg ekvivalenata galne kiseline (GAE) po kg (4)

Komponenta	Crno grožđe	Bijelo grožđe
Pokožica	1,86	904,0
Pulpa	41,0	35,0
Sok	206,0	176,0
Sjemenke	3,25	2,78
Ukupno	5,63	3,89

1.2. Flavonoidi

Flavonoidi spadaju u najveću i kemijski najraznolikiju grupu fenolnih spojeva. Kod crnih vina flavonoidi čine 80-90% od sadržaja ukupnih fenola. Oni mogu biti slobodni ili vezani sa drugim flavonoidima, neflavonoidima, šećerima ili kombinacijom i jednih i drugih. Način predobrade grožđa, kao i sam tijekom vinifikacije bitno utječu na fenolni sastav vina. U skupinu flavonoida spadaju: flavanoli, flavonoli, flavoni, antocijani i ostali (tablica 2) (4).



Slika 1. Struktura flavonoida (5)

Tablica 2. Glavni predstavnici flavonoida (6)

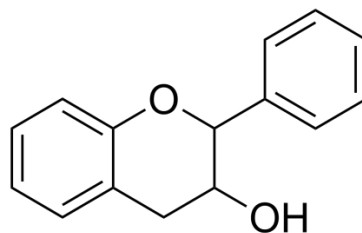
Podskupine	Glavni predstavnici
Flavanoli	Katehin, Epikatehin, Galokatehin
Flavonoli	Miricetin, Kvercetin, Kemferol
Flavoni	Apigenin, Luteolin
Izoflavoni	Orbotol, Daidzein
Antocijani	Cijanidin, Petunidin, Peonidin, Malvidin

Antocijani su fenoli koji su zaslužni za različita obojenja, od svijetlo ružičaste do tamno ljubičaste boje (tablica 3). Osim što ove molekule daju boju vinu, poznati su i kao jaki antioksidansi (7).

Tablica 3. Vrste antocijana i njihove boje (8)

Antocijani	Boja
Cijanidin	Crvena
Delfinidin	Roza
Peonidin	plava s nijansom crvene
Petudinin	plavo-crvena
Malvidin	crvena s nijansom plave

Za razliku od antocijana, flavan-3-oli (slika 2) su bezbojni spojevi koji ne utječu na boju vina, ali mu daju trpak okus. Koncentracija flavan-3-ola u bijelim vinima se obično kreće od 10-50 mg/L, dok u crnim vinima može biti i do 200 mg/L (4).

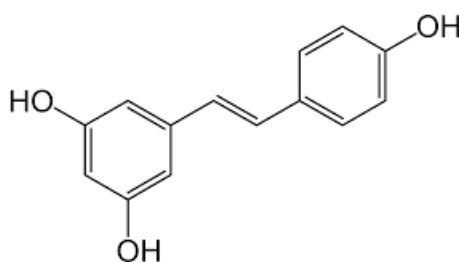


Slika 2. Struktura flavanola (9)

Flavonoli su žuti pigmenti smješteni u pokožici boba i uglavnom su nositelji boje bijelih vina, dok su u crnim vinima prisutni u puno nižim koncentracijama. Nalaze se obično u glikozidnoj formi, a najzastupljeniji šećer u njihovom sastavu je glukoza. Koncentracija flavonola u grožđu varira od 10-100 mg/kg, a neki od poznatijih su: kemferol, miricetin te kvercetin (10).

1.3. Neflavonoidi

Neflavonidi uključuju fenolne kiseline koje se dijele na hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline, te posebnu skupinu- stilbene. Fenolne kiseline su smještene u vakuolama stanica u mesu i pokožici boba grožđa. U vodenim otopinama alkohola one su bezbojne, ali oksidacijom mogu razviti žutu boju. Iako nemaju određenu aromu i okus, prekursori su u sintezi nekih hlapivih fenola koje proizvode mikroorganizmi (10).



Slika 3. Struktura neflavonoida (11)

Najznačajnija hidroksibenzojeva kiselina je galna kiselina, čija je prosječna koncentracija u bijelim vinima oko 7 mg/L, a u crnim vinima oko 95 mg/L. Pored galne kiseline u derivate hidroksibenzojeve kiseline ubrajamo i vanilinsku, *p*-hidroksibenzojevu, protokatehinsku i siriginsku kiselinu (10).

Hidroksicimetne kiseline su uglavnom prisutne kao esteri vinske kiseline iako mogu biti povezane i sa šećerima. Najviše ih ima u pokožici, a njihova koncentracija je oko 10 mg/L. Najvažniji predstavnici ove podgrupe fenolnih kiselina su *p*-kumarinska, kafeinska, ferulinska i sinapinska kiselina (10).

1.4. Stilbeni

Stilbeni su spojevi koji sadrže dva benzenska prstena povezana molekulom etanola ili etilena. Ne daju značajan doprinos u boji ili nekim drugim organoleptičkim svojstvima vina, ali posjeduju brojna biološka svojstva. Najznačajniji stilben je resveratrol, koji se oslobađa tijekom procesa proizvodnje crnih vina iz pokožice crnog grožđa (10).

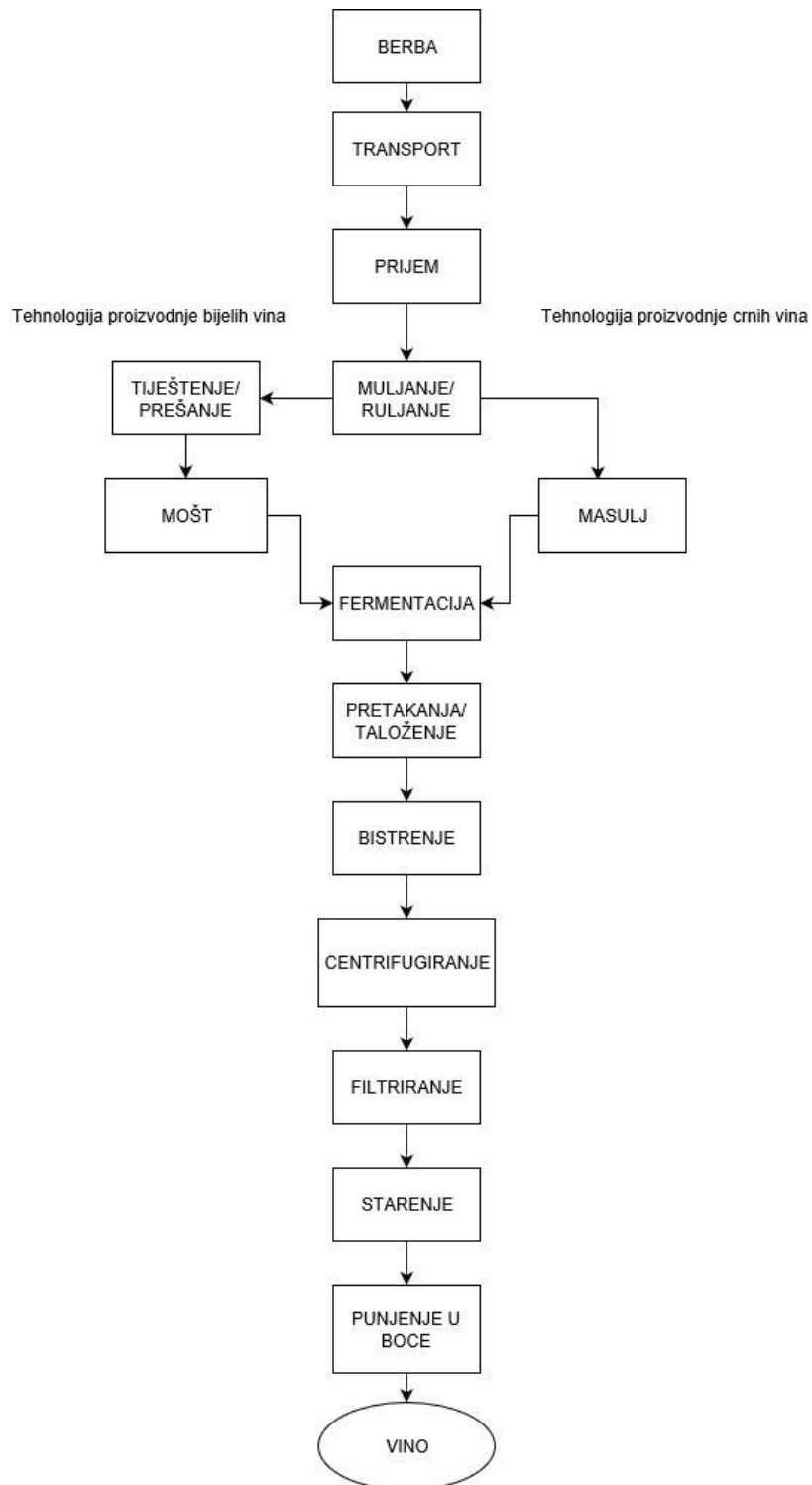
Resveratrol je biološki aktivni spoj, sekundarni biljni metabolit i prirodni antioksidans koji pozitivno utječe na ljudsko zdravlje. Brojna biološka svojstva resveratrola, kao što su kardioprotektivna, antitumorska, neuroprotektivna, antimutagena i dr. su jako dobro istražena i dokazana brojnim studijama (12). Posebna pažnja se ovom fitoaleksinu posvećuje od 1992. godine kada se pojavljuje pojam *Francuskog paradoksa* (13). Otkriveno je i statistički potvrđeno kako ljudi u nekim dijelovima Francuske rjeđe obolijevaju od kardiovaskularnih bolesti usprkos prehrani bogatoj masnoćama, a sve zahvaljujući konzumaciji crnog vina i/ili druge hrane bogate resveratrolom.

Od navedenih bioloških svojstava, osim antioksidativnog, vrlo često se ističe i antimikrobno djelovanje resveratrola prema čestim bakterijskim uzročnicima kvarenja hrane kao što su npr. *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, itd. (14, 15).

1.5. Utjecaj postupka vinifikacije na sadržaj fenola

Vinifikacija predstavlja skup tehnoloških procesa kojima se grožđe prevodi u vino. Određene tehnike vinifikacije mogu utjecati na ukupnu koncentraciju fenolnih spojeva u vinu, stoga enolozi odlučuju koji postupak vinifikacije žele provesti u svrhu dobivanja vina sa željenim karakteristikama. Svaki proces vinifikacije započinje berbom, transportom u podrum te prijemom grožđa. Nakon toga slijedi primarna prerada, odnosno postupci muljanja i runjenja, odnosno strojevima se odvajaju bobice od peteljke (runjenje), nakon čega se bobice gnječe (muljanje) kako bi se potaknula i ubrzala ekstrakcija tvari boje i drugih spojeva iz grožđa. Već u slijedećoj fazi proizvodnje vina se uočavaju razlike u procesu prerade bijelih i crnih vina (slika 4.) (16).

Nakon prve faze kod proizvodnje bijelih vina u proces prerade, tj. na fermentaciju ide groždani sok (mošt) dobiven cijedenjem/prešanjem čitavog masulja, dok kod crnih vina fermentira masulj (zgnječeno grožđe s peteljkinom ili bez nje) (16).



Slika 4. Shematski prikaz tehnologije proizvodnje vina (17)

U svrhu sprječavanja neželjenih procesa tijekom vinifikacije, kao enološko sredstvo koristi se sumpor. Njegova djelovanja su višestruka, služi za sprječavanje oksidacijskih procesa, inaktivira prirodnu mikrofloru (plijesni i kvasci) i ubrzava taloženje čestica mutnoće (budući da utječe na koagulaciju bjelančevina pri taloženju mošta), itd. Količina dodanog sumpora ovisi o zrelosti, zdravstvenom stanju grožđa, temperaturi grožđa i mošta/masulja, itd. (18). Dodavanje sumpora može utjecati na brzinu ekstrakcije i konačni udio fenola u vinu, pa tako tijekom vinifikacije može imati utjecaja na smanjenje brzine gubitka boje vina i sprječavanje polimerizacije fenola (19).

Procesom fermentacije započinje stvaranje vina, tj. u anaerobnim uvjetima kvasac razlaže šećer iz mošta/masulja, do alkohola i ugljikovog dioksida. Duljina trajanja fermentacije ili duljina trajanja kontakta čvrste i tekuće faze (maceracije) vrlo je važna za ekstrakciju fenola. Trajanje maceracije jako utječe na kakvoću vina, osim ukupnog sadržaj fenola, ona daje najveći doprinos razvoja mirisa i bukea vina. Najčešće se, za proizvodnju crnih vina, preporuča kratka maceracija od 2 do maksimalno 10 dana, dok kod proizvodnje rose vina maceracija traje svega nekoliko sati. Za razliku od crnih vina, maceracija bijelih vina se može provoditi i duži vremenski period, ali na nižim temperaturama (16, 19).

Nakon završetka procesa fermentacije slijedi pretkanje, bistrenje, tiho vrenje i drugi postupci njege i dorade vina (16).

1.5.1. Ekstrakcija fenolnih spojeva tijekom procesa vinifikacije

Prethodno je već istaknuto da ekstrakcija fenolnih spojeva započinje muljanjem i nastavlja se prešanjem u slučaju proizvodnje bijelog vina (dobivanje mošta). U slučaju proizvodnje crnih vina, zbog provođenja vrenja na masulju, ekstrakcija fenolnih spojeva je puno značajnija. U crnim vinima tako imamo oko 60% ekstrahiranih fenolnih spojeva, od čega oko 38% čine antocijani i 20% tanini. Prevelika koncentracija tanina može dovesti do astringencije i trpkog okusa vina, pa se npr. kod proizvodnje mladih vina provodi kratka maceracija u svrhu što manje ekstrakcije tanina. (20)

U odnosu na mlada vina kod kojih je nepoželjna astringencija i trpak okus, barique vina zahtijevaju veće količine tanina pa se provodi duža maceracija. Tijekom maceracije, osim što se povećava koncentracija antocijana i tanina, može doći i do povećanja koncentracije kalija, koji dovodi do promjene pH i početka procesa taloženja tartarata. Količina fenolnih spojeva u vinu ovisi i o brojnim drugim faktorima kao što su: sadržaj sumpora, temperatura i koncentracija etanola. Ukupna koncentracija fenolnih spojeva u bijelim vinima iznosi 50-350 mg/L GAE, dok je u crnim vinima 800-4000 mg/L GAE **(10)**. Što je duži kontakt pokožice, sjemenki i mesa bobice tijekom fermentacije, to će ekstrakcija fenola biti bolja. Vina s većim sadržajem fenola bit će više oporna i trebat će im puno više vremena da dozriju **(2)**.

Kad je riječ o antocijanima, najbrža ekstrakcija se događa tijekom prvih nekoliko dana. Nakon što koncentracija etanola dosegne određenu vrijednost, količina antocijana se počinje smanjivati zbog adsorpcije (kvasaca i krutih tvari bobice) ili modifikacijom njihove strukture (formiranjem taninsko - antocijanskih kompleksa). Proces ekstrakcije tanina iz pokožice odvija se zajedno sa antocijanima, ali puno sporije. Tanini iz sjemenki se ekstrahiraju nakon što se njena kutikula otopi u alkoholu. Što proces maceracije dulje traje, količina tanina u crnim vinima se povećava **(10)**.

1.6. Biološka aktivnost vina

Poznato je kako vino ima izrazito jaku biološku aktivnost koja se uglavnom pripisuje udjelu fenolnih spojeva u njima. Također je poznato kako udio fenola u grožđu ovisi o morfološkim i agronomskim karakteristikama te prvenstveno samoj sorti vinove loze. Dokazano je da što je veća koncentracija fenolnih spojeva u vinu to je jača njegova antioksidacijska i antimikrobna aktivnost. Nedavne studije su pokazale kako umjerena konzumacija crnog vina smanjuje rizik od nastanka kardiovaskularnih bolesti. Osim već navedenih bioloških svojstava, vino pokazuje antiviralna i protupalna djelovanja koja se temelje na inhibiciji funkcije enzima, pucanju staničnih membrana i prodiranju fenola u stanice **(20)**.

1.6.1. Antioksidacijska aktivnost

Za vina je dokazano kako posjeduju jako dobra antioksidacijska svojstva. Posebna pažnja se pri tome pridaje fenolima koji su sposobni inhibirati oksidacijske procese u našem organizmu ili ukloniti slobodne radikale (20). Oni se ovisno o vrsti i sorti vina nalaze u različitim koncentracijama, pa tako znamo da crna vina imaju puno veći (i do deset puta) antioksidacijski kapacitet nego li bijela vina, upravo zbog većeg sadržaja fenola (21). Crno vino sadrži i do 3000 mg/L ukupnih fenola, što je zapravo ukazuje na njegovu jaku antioksidacijsku sposobnost (20).

Fenolne kiseline utječu na lipidnu peroksidaciju zbog čega se često koriste kao antioksidansi i konzervansi. Tako npr. ferulinska i galna kiselina inhibiraju i do 80% virusa humane imunodeficijencije. Način skladištenja vina bitno utječe na njegov antioksidacijski kapacitet. Vino skladišteno u hrastovim bačvama može imati veći antioksidacijski kapacitet u odnosu na vino skladišteno u staklenim bocama, zbog već spomenutih tanina, čija se koncentracija povećava tijekom dozrijevanja vina u drvenim bačvama (21).

1.6.2. Antimikrobna aktivnost

Slično kao i kod antioksidacijske aktivnosti, zasluge za dokazanu antimikrobnu aktivnost većinom se pripisuju prisutnim fenolnim spojevima. Ovisno o fenolnom sastavu vina, dokazano je kako ona imaju sposobnost inhibicije rasta širokog spektra različitih bakterijskih vrsta i sojeva. (20, 22). Iako neke fenolne kiseline pokazuju antimikrobna svojstva, njihov mehanizam djelovanja još uvijek nije u potpunosti razjašnjen. Antimikrobna aktivnost vina se povećava pri niskim pH vrijednostima, s tim da još uvijek nije utvrđeno je li je riječ o baktericidnoj ili bakteriostatičkoj aktivnosti (21).

U odnosu na fenolne kiseline, resveratrol pokazuje jaku antimikrobnu aktivnost iako je u vinu prisutan u malim koncentracijama. Iz navedenog se može zaključiti da koncentracija pojedinih fenolnih spojeva (fenolnih kiselina, polifenola, stilbena), prisutnih u vinu, ne mora biti ključan faktor za njegovu bolju ili lošiju antimikrobnu aktivnost (23).

Obzirom na velike razlike u strukturi pojedinih fenola i njihov mehanizam djelovanja može biti različit. Iako mehanizam njihova djelovanja nije u potpunosti razjašnjen, poznato je da fenoli općenito mogu djelovati na citoplazmatsku membranu, staničnu stjenku, nukelinske kiseline i na taj način mijenjati ili inhibirati njihovu funkciju. Također, fenoli imaju sposobnost denaturacije enzima ili vezanja na vitamine, minerale i ugljikohidrate čineći na taj način ove molekule nedostupne mikroorganizmima (23).

Osim vina, antimikrobnu aktivnost pokazuju i razni ekstrakti vina te nusprodukti vinifikacije (pokožica, komina, sjemenke). Primjerice, groždani sok i ekstrakt pokožice crnog grožđa inhibiraju *Listeria monocytogenes*. Ekstrakti lišća vinove loze, kao i ekstrakti pokožica grožđa pokazuju dobra antimikrobna svojstva prema različitim Gram negativnim i Gram pozitivnim bakterijskim vrstama (24, 25, 26).

1.6.2.1. Patogeni uzročnici kvarenja hrane

Hrana sadrži sve nutrijente koji su potrebni za rast mikroorganizama, i kao takva, podložna je kontaminaciji i kvarenju. U mikroorganizme kao glavne kontaminante hrane ubrajamo bakterije, kvasce i gljivice, a među njima najznačajnije su bakterije koje mogu uzrokovati infekcije i intoksikacije. Infekcija označava unos žive bakterije putem hrane, a intoksikacija otpuštanje toksina u hranu ili domaćina nakon njene konzumacije. Bakterije možemo na osnovu metode bojanja po Gramu podijeliti na Gram pozitivne i Gram negativne. Gram pozitivne bakterije zadržavaju ljubičastu boju i nakon ispiranja sa alkoholom nakon postupka bojenja, dok Gram negativne vrste nakon ispiranja gube boju. Razlog tome su razlike u građi stanične stjenke između ovih organizama. Naime, Gram pozitivne bakterije imaju veći sloj peptidoglikana zbog čega se boja od metilen ljubičastog zadržava u stjenci u odnosu na Gram negativne kod kojih to nije slučaj. Kod Gram negativnih bakterija postoji dodatna vanjska membranu koja je građena od lipida, dok je stanična stjenka odvojena od stanice periplazmatskim prostorom. U tablici 4 su prikazane neke od značajnijih Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija (27).

Tablica 4. Najčešće Gram pozitivne i Gram negativne bakterije u hrani (27)

Gram pozitivne	Gram negativne
<i>Clostridium botulinum</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Salmonella enterica</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Yersinia pestis</i>

Salmonella enterica (*S. enterica*) je Gram negativna, fakultativno anaerobna bakterija. Pronalazimo ju u gastrointestinalnom sustavu zaraženih ljudi i životinja. Stanice su jako osjetljive na toplinu, stoga termički dobro obrađena hrana u pravilu neće biti kontaminirana ovim mikroorganizmima. Do kontaminacije može doći uslijed konzumacije nedovoljno termički obrađene hrane, kao što su sirovo mlijeko, jaja, meso i mesni proizvodi (27).

Escherichia coli (*E. coli*) je poput *S. enterica* fakultativni anaerobni štapić. Riječ je o Gram negativnoj bakteriji koja je dio normalne flore probavnog sustava. Većinom je bezopasna, ali u određenim uvjetima može dovesti do pojave različitih bolesti. Bakterija je vrlo otporna i lako se prilagođava novonastalim uvjetima života. Uvijek se povezuje sa lošim higijenskim navikama kao i neadekvatnim rukovanjem sa hranom te je ujedno najbolji pokazatelj fekalnog zagađenja vode. Najčešći je kontaminant mlijeka i mliječnih proizvoda te svježeg voća i povrća (27).

Listeria monocytogenes (*L. monocytogenes*) je fakultativno anaerobna, Gram pozitivna bakterija. Jako je prilagodljiva i može rasti pri niskim temperaturama i visokim koncentracijama soli (27). Ima sposobnost razmnožavanja pri niskim temperaturama, pa se može naći u namirnicama koje se čuvaju u hladnjacima ili čak u zamrzivačima. Može biti prisutna u mlijeku i mliječnim proizvodima, mesu i morskim plodovima (28).

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) ili zlatni stafilokok je fakultativni anaerob koji pripada Gram pozitivnim bakterijama. Nalazi se u sastavu normalne flore respiratornih organa i kože. Uzročnik je alimentarnih toksikoinfekcija. Vršiti sintezu nekoliko različitih toksina, a najopasniji za čovjeka su enterotoksini. Najčešći je kontaminant hrane životinjskog porijekla, ali u ljudski organizam može ući i preko otvorenih rana ili opekotina (27).

Enterococcus faecalis (*E. faecalis*) je kao i ostale opisane bakterije fakultativni anaerob koji pripada Gram pozitivnim bakterijama. Stanovnik je normalne flore probavnog sustava i sluznice, ali ako se nađe u drugim dijelovima tijela može uzrokovati ozbiljne infekcije. Jako je otporna bakterija koja raste pri visokim temperaturama, otporna je i na antibiotike. Najčešće se prenosi s osobe na osobu zbog loših higijenskih uvjeta, a njena prisutnost u hrani ukazuje na fekalno zagađenje i nehigijensko postupanje prilikom pripreme hrane (29).

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Materijal

U eksperimentalnom dijelu ovog rada korištena su vina iz berbe 2015. godine: tri bijela vina proizvedena u vinariji Krauthaker (Kutjevo) i dva crna vina iz vinarije Volarević (Prud, Metković). Od bijelih vina ispitana je Graševina standardna - GS (bez maceracije, sumporena), Graševina macerirana i sumporena - GM+SO₂ (120 dana maceracije) te Graševina macerirana bez dodanog sumpora - GM (120 dana maceracije), a od crnih vina, vino Plavac mali (PM) standardni (7 dana maceracije) i PM rose (0 dana maceracije). Do provođenja analize uzorci vina su čuvani u hladnjaku pri temperaturi +4°C, a boce su otvorene neposredno prije samog početka eksperimenta.

2.1.1. *Plavac mali crni*

Plavac mali crni spada među najvažnije i najpoznatije hrvatske vinske sorte, a potomak je *Dobričića* i *Crljenka kaštelanskog*. Veoma je značajan zbog obilate rodosti i velike otpornosti na nametnike i bolesti. Daje intenzivno obojena i jaka vina zbog kasnog dozrijevanja, a osim toga ima i visok udio fenola. Najviše fenola ima u pokožici i sjemenkama, odakle vinifikacijom prelaze u vino (30).



Slika 5. Plavac mali (Volarević)

2.1.2. Graševina

Graševina isto tako spada među najzastupljenije hrvatske vinske sorte. Isto kao i *Plavac mali*, izuzetno je velike rodnosti. Kvaliteta grožđa i vina ovisi o vinogradarskim područjima, ali ono što svaku *Graševinu* čini istom je njena zelenkasto-žuta boja i karakterističan okus (31). Graševina ima kiselkasta obilježja jer prilikom proizvodnje ne dolazi do malolaktičke fermentacije, a nakon proizvodnje pohranjuje se pri jako niskim temperaturama kako bi došlo do kristalizacije soli vinske kiseline (32).



Slika6. Graševina (Kutjevo)

2.2. Reagensi korištene za određivanje antimikrobne aktivnosti

- *Fosfatni pufer* (Phosphate Buffered Saline, *PBS*): 1 tableta (*Biolife, Italija*) otopi se u 100 mL destilirane vode, nakon čega se otopina sterilizira 10 minuta u autoklavu (121°C; 1,2 bara).
- *Mueller-Hinton bujon* (*MHB*): U staklenu bocu od 1 L izvaže se 10,5 g *MHB* (*Biolife, Italija*) kojem se doda 500 mL destilirane vode. Sadržaj se dobro promiješa, a zatim se staklenka stavi u mikrovalnu pećnicu tijekom 2 minute kako bi se sadržaj bolje otopio. Pripravljena otopina se potom sterilizira (autoklav, 20 minuta).
- *Mueller-Hinton agar* (*MHA*): 19 g *MHA* (*Biolife, Italija*) otopi se u 500 mL destilirane vode. Otopina se stavi 2 minute u mikrovalnu pećnicu nakon čega se sterilizira (autoklav, 20 minuta). Tekući agar ohlađen na temperaturu oko 44°C se odmah poslije sterilizacije razlije u sterilne petrijeve posude (otprilike po 15 mL). Nakon hlađenja, Petrijeve posude s agarom se do korištenja čuvaju u hladnjaku pri +4°C.

2.3. Bakterijske kulture

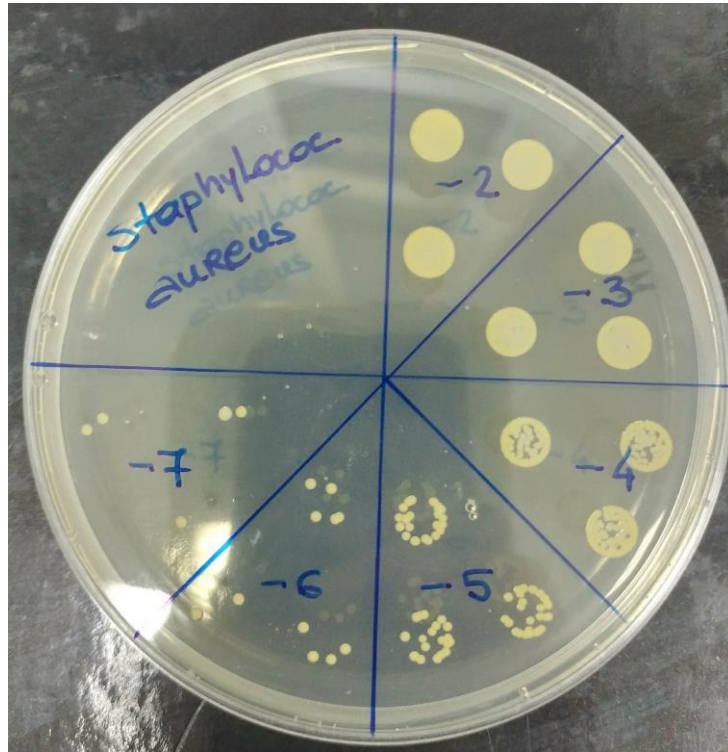
Za određivanje antimikrobne aktivnosti vina u ovom radu korišteni su bakterijski sojevi: *Staphylococcus aureus* 25923, *Enterococcus faecalis* 29219, *Listeria monocytogenes* DG 3269, *Salmonella enterica* i *Escherichia coli* 25922. Svi korišteni sojevi su ATCC (engl. American Type Culture Collection), osim *L. monocytogenes* koja je klinički izolat preuzet iz Kliničkog bolničkog centra Split. Bakterijske kulture su preuzete s dubokog hranjivog agara i uzgojene na krvnom agaru koji sadrži 5% ovčje krvi u aerobnim uvjetima pri 37°C. Ovako uzgojeni sojevi čuvani su u hladnjaku pri +4°C.

Prije početka pokusa svaka od navedenih bakterijskih kultura je revitalizirana na način da je ezom prenesena s krvnog agara na hranjivi MHA agar i inkubirana 20-24 h pri 35°C. Ovako pripravljena kultura koristi se za pripremu inokuluma na način da se ezom prenese bakterijska kolonija u MHB agar i uz pomoć Densitomata namjesti turbiditet suspenzije od 0,5 McFarlanda, što odgovara gustoći od 10^7 - 10^8 kolonija (engl. *Colony Forming Units*, CFU) po 1 mL. Od ove suspenzije se potom otpipetira 2 mL bakterijske kulture u novu sterilnu posudicu s 38 mL MHB-a i ovako pripravljen inokulum ima koncentraciju bakterijskih stanica 10^6 - 10^7 CFU/mL i koristi se u daljnjim postupcima testiranja antimikrobnog djelovanja.

2.4. Kontrola inokuluma

Kao potvrda koncentracije bakterijskih stanica u inokulumu koristi se metoda po Kochu. Kod ove metode se od inokuluma pripravi serija decimalnih razrjeđenja (do 10^6) koji se nakapaju (engl. *Drop plate method*) na hranjivi agar te se nakon inkubacije broje porasle bakterijske kolonije. Za pripremu prvog razrjeđenja, u mikro-epruvete (2,0 mL; Eppendorf) se pipetira 50 μ L inokuluma i 450 μ L PBS-a, i dobro promiješa. Drugo razrjeđenje pripremi se tako da se pipetira 50 μ L prvog razrjeđenja inokuluma i 450 μ L PBS, i tako redom sve do šestog razrjeđenja. Od svih se pripremljenih razrjeđenja, po tri kapi volumena 10 μ L nakapaju na hranjivu MHA podlogu, te se potom stave na inkubaciju tijekom 24 sata pri optimalnoj temperaturi rasta testiranog mikroorganizma (26, 33).

Nakon inkubacije, kolonije porasle na hranjivoj podlozi u Petrijevim posudama se prebroje, a dobiveni rezultat potvrđuje broj jedinica koje formiraju kolonije (CFU) po 1 mL uzorka (26, 34).



Slika 7. Izgled kontrole inokuluma.

2.5. Metode određivanja antimikrobne aktivnosti

Antimikrobna učinkovitost vina istražena je MIC metodom odnosno metodom određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (34), disk difuzijskom metodom i metodom difuzije u jažicama (35).

Otopine, pribor i posude korištene za određivanje antimikrobnih svojstava prethodno je sterilizirano. Svi postupci provedeni u ovom radu urađeni su pri sterilnim uvjetima.

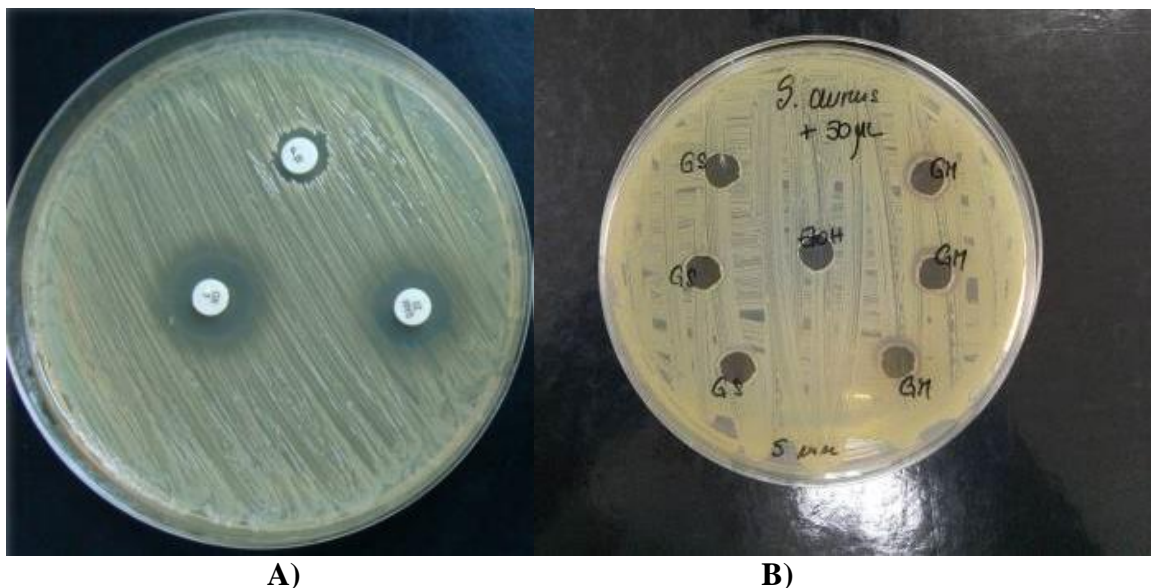
2.5.1. Metoda određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC)

MIC vrijednost predstavlja najnižu koncentraciju antimikrobnog agensa koja potpuno inhibira rast mikroorganizama. Prilikom izvođenja ove metode koriste se sterilne mikrotitarske pločice s 96 otvora. Testirani uzorci vina (prethodno odgovarajuće razrijeđeni u MHB) serijski se razrjeđuju u MHB duž mikrotitarske pločice i to tako da se 50 μL uzorka prenese u sljedeći otvor na pločici koji sadrži 50 μL MHB te izmiješa. Volumen od 50 μL novog razrjeđenja prenese se istim postupkom u sljedeći otvor i tako se postupak ponavlja sve do kraja mikrotitarske pločice. Ovakvim načinom razrjeđivanja, početna koncentracija testiranog uzorka se razrijedi duž pločice tako da je svaka sljedeća koncentracija upola niža od prethodne. Konačni volumen u svakom otvoru nakon razrjeđivanja iznosi 50 μL . U svrhu kontrole rezultata na svakoj se pločici pripremi slijepa proba (100 μL MHB), pozitivna kontrola (50 μL MHB + 50 μL bakterijske kulture) i negativne kontrole za svaki uzorak i korišteno otapalo (etanol, w (EtOH) = 13%) (50 μL MHB + 50 μL vino). Nakon toga, u sve otvore mikrotitarske pločice, osim u slijepu probu i negativne kontrole, doda se po 50 μL ispitivanih kultura bakterija (33). Po dodatku bakterijskih kultura, suspenzije u pločicama se izmiješaju (laganim okretanjem i treskanjem pločice rukom po radnoj površini), i nakon 24-satne inkubacije (35°C) vizualno se očitavaju rezultati korištenjem ogledala s povećalom. Usporedbom gustoće i zamućenja pozitivne kontrole, slijepa probe i negativne kontrole s zamućenjem u otvorima mikrotitarske pločice s analiziranim uzorcima očitava se MIC vrijednost. MIC vrijednost je ona koncentracija antimikrobnog agensa prisutna u prvom nezamućenom otvoru pločice (33, 35). Ispitivanja su urađena u tri ponavljanja.

2.5.2. Disk difuzijska metoda

Cilj ove metode je odrediti inhibiciju rasta bakterija oko diska s određenom koncentracijom vina. Međutim, bakterijska inhibicija rasta ne znači bakterijsku smrt, stoga ova metoda ne razlikuje batericidne i bakteriostatske efekte. No usprkos tome ova metoda ima i nekoliko prednosti, a to su niska cijena, mogućnost testiranja više bakterijskih vrsta, jednostavnost i lako očitavanje rezultata (35).

Disk difuzijska metoda se izvodi u Petrijevim zdjelicama na čvrstoj hranjivoj podlozi određenog sastava. Na diskove se nacjepljuje čista bakterijska kultura određene koncentracije bakterijskih stanica u inokulumu (CFU/mL). Nakon nanošenja bakterijske kulture na hranjivu podlogu Petrijeve zdjelice se ostavljaju 2-3 minute da se osuše. U sterilnu i praznu Petrijevu zdjelicu se za to vrijeme pripreme diskovi od filter papir (promjera 6 mm) prethodno natopljeni ispitivanim uzorkom vina. Na površinu agara s bakterijskom kulturom se polože diskovi i lagano pincetom utisnu u podlogu, nakon čega Petrijeve zdjelice idu na inkubaciju (okreću se na poklopac) 20-24 h pri 35°C. Završetkom inkubacije slijedi mjerenje zona inhibicije. Ukoliko je zona inhibicije bila ≥ 12 mm smatra se da ispitivani uzorak ima dobar inhibitorski učinak. Ispitivanje je provedeno u tri ponavljanja (36).



Slika 8. Izgled zone inhibicije primjenom: **A)** disk difuzijske metode (37) i **B)** metode difuzije u jažicama (vlastita fotografija)

2.5.3. Metoda difuzije u jažicama

Metoda difuzije u jažicama jako je slična već opisanoj disk difuzijskoj metodi. Nakon inokulacije bakterijskim kulturama, na hranjivu podlogu Petrijeve zdjelice i sušenja u trajanju od 2-3 minute, u agaru se buše jažice (rupe) promjera 7-8 mm. Potom se u svaku jažicu dodaje po 50 μ L ispitivanog vina, nakon čega se Petrijeve zdjelice stave u hladnjak na 1 h kako bi se omogućilo difundiranje aktivnih komponenti vina u hranjivu podlogu. Nakon toga slijedi inkubacija pod određenim uvjetima (35°C, 20-24h), a nakon provedene inkubacije mjerenje zona inhibicije **(35)**. I u ovom slučaju zona inhibicije ≥ 12 mm predstavlja dobar inhibitorni učinak vina **(36)**. Ispitivanje je provedeno u tri ponavljanja.

3. REZULTATI

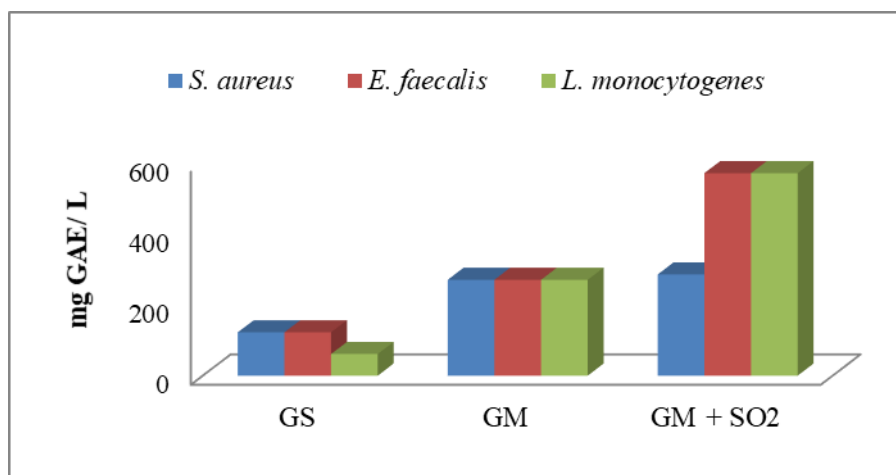
3.1. Rezultati određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC)

Tablica 5. MIC vrijednosti vina izražene u mg GAE/L za Gram pozitivne bakterije

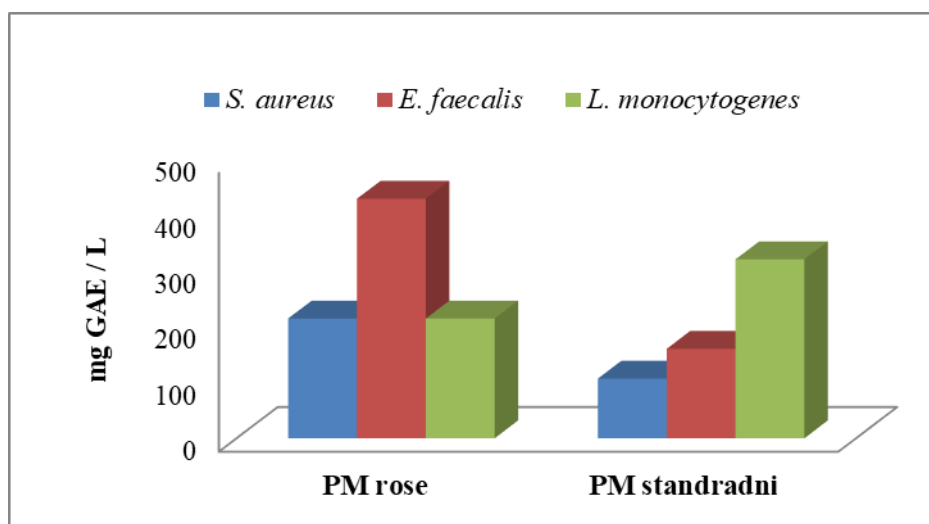
Uzorak	<i>S. aureus</i>			<i>E. faecalis</i>			<i>L. monocytogenes</i>		
GS	122,0	122,0	122,0	122,0	122,0	122,0	61,0	61,0	61,0
GM	269,9	269,9	269,9	269,9	269,9	269,9	269,9	269,9	269,9
GM+SO ₂	285,0	285,0	285,0	570,0	570,0	570,0	570,0	570,0	570,0
PM rose	214,8	214,8	214,8	429,6	429,6	429,6	214,8	214,8	214,8
PM standardni	80,25	80,25	160,5	160,5	160,5	160,5	321,0	321,0	321,0

Tablica 6. MIC vrijednosti vina izražene u mg GAE/L za Gram negativne bakterije

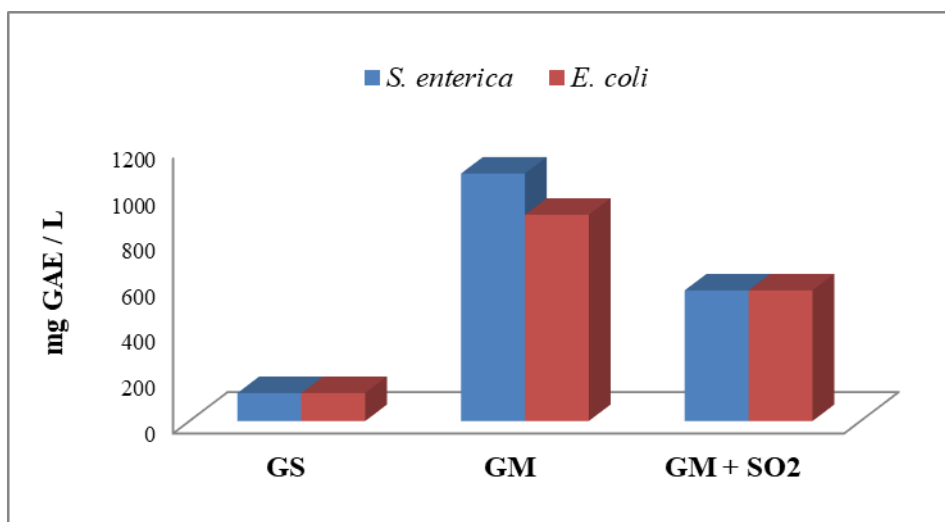
Uzorak	<i>S. enterica</i>			<i>E. coli</i>		
GS	122,0	122,0	122,0	122,0	122,0	122,0
GM	1079,6	1079,6	1079,6	539,8	539,8	539,8
GM+SO ₂	570,0	570,0	570,0	570,0	570,0	570,0
PM rose	429,6	429,6	429,6	429,6	429,6	429,6
PM standardni	1284,0	1284,0	1284,0	642,0	642,0	642,0



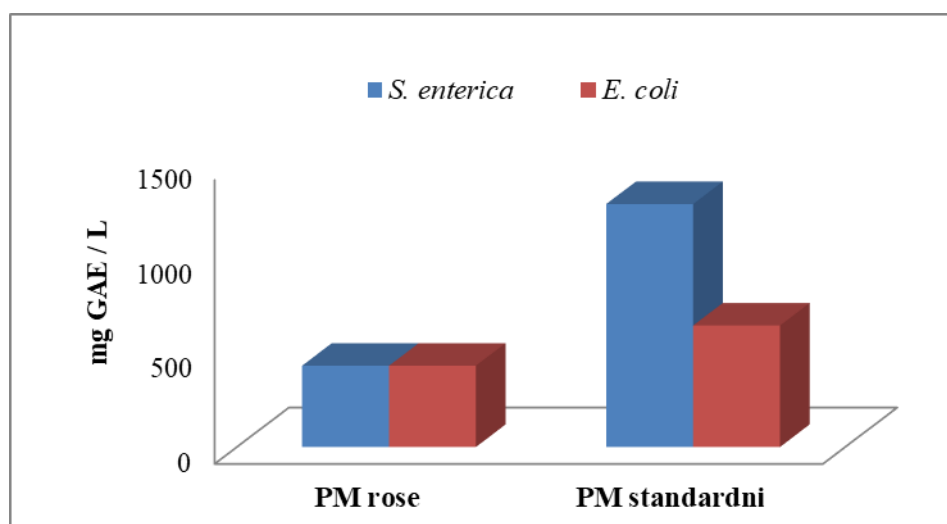
Slika 9. Grafički prikaz antimikrobnoga djelovanja bijelih vina prema Gram pozitivnim bakterijama



Slika 10. Grafički prikaz antimikrobnoga djelovanja crnih vina prema Gram pozitivnim bakterijama



Slika 11. Grafički prikaz antimikrobnoga djelovanja bijelih vina prema Gram negativnim bakterijama



Slika 12. Grafički prikaz antimikrobnoga djelovanja crnih vina prema Gram negativnim bakterijama

3.2. Rezultati određivanja antimikrobne aktivnosti metodom difuzije u jažicama

Tablica 7. Prikaz zona inhibicije (mm) dobivenih metodom difuzije u jažicama za Gram pozitivne bakterije

Uzorak	<i>S. aureus</i>			<i>E. faecalis</i>			<i>L. monocytogenes</i>		
GS	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GM	12	12	12	11	10	10	10	10	10
GM+SO ₂	10	11	11	8	9	8	0	0	0
PM rose	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PM standardni	13	13	13	11	12	12	10	10	11

Tablica 8. Prikaz zona inhibicije (mm) dobivenih metodom difuzije u jažicama za Gram negativne bakterije

Uzorak	<i>S. enterica</i>			<i>E. coli</i>		
GS	0	0	0	0	0	0
GM	0	0	0	10	10	9
GM+SO ₂	0	0	0	0	0	0
PM rose	0	0	0	0	0	0
PM standardni	0	0	0	9	9	10

3.3. Rezultati određivanja antimikrobne aktivnosti disk difuzijskom metodom

Ispitivana vina nisu pokazala antimikrobnu aktivnost, odnosno nije bilo zona inhibicije bakterijskog rasta.

4. RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je odrediti antimikrobnu aktivnost vina prema patogenim mikroorganizmima koji se mogu pronaći u hrani, odnosno odrediti inhibicijsku sposobnost bijelih i crnih vina prema odabranih Gram pozitivnim i Gram negativnim bakterijskim vrstama korištenjem različitih metoda testiranja.

Uz primjenu različitih metoda određivanja antimikrobnog učinka testiranih vina, te razlike u sorti i vrsti vina, u ovom radu cilj je bio odrediti da li je duljina trajanja maceracije, koja je primijenjena tijekom postupka proizvodnje vina, imala utjecaja na njihovu aktivnost. Dobiveni rezultati su prikazani u tablicama 5-8 i na slikama 9-12.

U tablicama 5 i 6 prikazani su rezultati MIC vrijednosti vina prema Gram pozitivnim i Gram negativnim bakterijama svih urađenih ponavljanja (n=3) iz čega se može uočiti jako dobra ponovljivost metode i potvrda dobivenih rezultata. Obzirom da MIC vrijednosti predstavljaju minimalnu koncentraciju nekog uzorka koja može inhibirati rast i razmnožavanje bakterija, niže vrijednosti predstavljale su bolji učinak u odnosu na više vrijednosti prikazane u tablici. Kako bi se lakše interpretirali dobiveni rezultati važno je poznavati i fenolni sastav vina, odnosno barem udio ukupnih fenola u vinu. Iako to nije bio predmet istraživanja ovog rada u tablici 9 dane su srednje vrijednosti sadržaja ukupnih fenola u vinu koje se analiziralo u ovom radu.

Tablica 9. Udio ukupnih fenola (UF) u vinima izražen u mg ekvivalenata galne kiseline (GAE)/L vina

Uzorak	UF (mg GAE/L)
GS	305,0
GM	2699,0
GM+SO ₂	2850,0
PM rose	1074,0
PM standardni	3210,0

Usporedbom sadržaja ukupnih fenola i MIC vrijednosti može se uočiti da su u pravilu sva testirana vina pokazala bolju aktivnost prema Gram pozitivnim bakterijskim vrstama u odnosu na Gram negativne, što se može pripisati jednostavnijoj građi stanične stijenke Gram pozitivnih vrsta, pa samim time i lakšem prolasku fenolnih komponenti u bakterijsku stanicu. Iako nije pravilo da vina s većim udjelom fenola pokazuju bolju antimikrobnu aktivnost u ovom slučaju je crno vino PM standardni pokazao izuzetno niske MIC vrijednosti prema ispitivanim Gram pozitivnim bakterijskim vrstama, osobito prema *S. aureus* (MIC = 107 mg GAE/L). No isto tako ne smijemo izostaviti GS koja je prema *L. monocytogenes* pokazala izuzetno dobru aktivnost i MIC vrijednosti od 61 mg GAE/L (tablica 5, slika 9). Od testiranih bijelih vina osobito se istaknula GS s niskim MIC vrijednostima prema Gram pozitivnim bakterijama obzirom na najmanji udio fenolnih spojeva u vinu. GM je pokazala prema svim Gram pozitivnim bakterijama istu aktivnost, dok je GM + SO₂ bila nešto lošija (slika 9). Kod crnih vina PM rose je imao dobru antimikrobnu aktivnost, no u usporedbi s PM standardnim bio je učinkovitiji samo prema *L. monocytogenes* (slika 10).

Razlika u građi bakterijskih vrsta već je istaknuta, kao i činjenica da Gram negativne bakterije imaju dodatnu vanjsku membranu zbog čega su otpornije na djelovanje raznih ekstrakata. U ovom radu posebno iznenađuje GS kod koje je MIC vrijednost i prema Gram negativnim bakterijama iznosila samo 122,0 mg GAE/L, dok se ista kod PM standardnog kretala od 642,0-1284,0 mg GAE/L (tablica 6, slika 11). PM rose je prema svim testiranim Gram negativnim bakterijama pokazao bolju aktivnost u odnosu na PM standardni (slika 12). Isti slijed se ponovio i kod GS koja je i prema Gram negativnim bakterijama imala najbolji učinak, dok je GM imala najveće MIC vrijednosti (tablica 6). Iako su GM i GM + SO₂ imale jako sličan udio fenola nisu pokazale slično djelovanje, pa je tako GM + SO₂ pokazala bolji učinak prema *S. enterica*, dok je GM niže MIC vrijednosti i bolji učinak imala prema *E. coli*.

Ovim rezultatima se zasigurno može potvrditi činjenica da utjecaj na antimikrobnu aktivnost nemaju samo fenoli prisutni u vinu, te da zasigurno jako velik utjecaj ima vrsta fenola kao i sinergijski učinak između pojedinih fenolnih komponenti koji se reflektira na ukupni antimikrobni učinak vina. Također pretpostavljeni faktor utjecaja maceracije, kao i dodatak sumpora u postupku vinifikacije ne možemo u potpunosti opravdati dobivenim rezultatima.

Rezultati metode difuzije u jažicama su prikazani u tablici 7 i 8 iz kojih možemo uočiti kako niti jedno vino nije uspjelo inhibirati rast *S. enterica*. Vidljivo je kako je PM standardni pokazao najbolji inhibitorni učinak (zona inhibicije ≥ 12 mm) i to prema *S. aureus* od Gram pozitivnih i *E. coli* od Gram negativnih bakterija. Što se tiče bijelih vina, također prema *S. aureus* najveću zonu inhibicije imala je GM (12 mm). Za razliku od prethodne metode, u ovom slučaju ni GS ni PM rose nisu pokazali nikakvu zonu inhibicije rasta Gram pozitivnih ni Gram negativnih bakterija. U interpretaciji ovih rezultata može se uzeti u obzir utjecaj duljine trajanja maceracije kao i sadržaj fenola na antimikrobni učinak vina. Ovom metodom su vina s većim udjelom fenola pokazala bolji učinak u usporedbi s vinima s manjim udjelom fenola. Ova činjenica se osobito dobro može uočiti u usporedbi PM standardnog i PM rose, te kod usporedbe GS i GM. Zanimljivo je da je na Gram negativne bakterijske vrste od bijelih vina djelovala samo GM i to prema *E. coli* (zona inhibicije 9-10 mm), dok GM + SO₂ nije pokazala nikakvu aktivnost (tablica 8).

Što se tiče disk difuzijske metode, sve zone inhibicije bile su jednake 0 mm, što znači da vina nisu pokazala antimikrobnu aktivnost. Upravo iz ovog razloga možemo zaključiti kako disk metoda i nije najbolja za procjenu antimikrobne aktivnosti vina što se već i u eksperimentalnom dijelu rada istaknulo kao nedostatak metode.

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu provedenog istraživanja i prezentiranih rezultata možemo zaključiti slijedeće:

- Analizirana vina su pokazala dobru antimikrobnu aktivnost određenu MIC metodom osobito prema Gram pozitivnim bakterijama.
- Od crnih vina najnižu MIC vrijednost pokazao je PM standardni i to prema *S. aureus*, a od bijelih vina GS prema *L. monocytogenes*.
- Metodom difuzije u jažicama, dokazano je da nijedno vino nije uspjelo inhibirati rast *S. enterica*.
- Najbolji inhibitorski učinak određen metodom difuzije u jažicama pokazao je PM standardni i to opet prema *S. aureus* od Gram pozitivnih i *E. coli* od Gram negativnih, dok GS i PM rose nisu pokazali nikakvu zonu inhibicije rasta.
- Primjenom disk difuzijske metode testirana vina nisu pokazala antimikrobnu aktivnost.
- Duljina trajanja maceracije i dodatak sumpora u samom postupku vinifikacije ne mogu se u potpunosti povezati s antimikrobnim učincima vina. Razlog tome nije samo fenolni sastav već i vrsta fenola prisutna u vinu kao i njihov međusobni sinergijski učinak koji se reflektira na ukupni antimikrobni učinak vina.

6. LITERATURA

1. de Beer D, Joubert E, Gelderblom WCA, Manley M. Phenolic compounds - A Review of their possible role as in vivo antioxidants of wine. *South African Journal of Enology and Viticulture*. 2002; 23(2): 48-61.
2. Naczki M, Shahidi F. *Phenolics in Food and Nutraceuticals*. New York: CRC Press; 2003.
3. Vinopedija, <http://vinopedia.hr/wiki/index.php?title=fenoli>, (PRISTUPLJENO 19.07.2018.)
4. Zoecklein BW, Fugelsang KC, Gump BH, Nury FS. *Wine analysis and production*. Springer- science+business media, BV. 1997.
5. Struktura flavonoida, https://www.google.ba/search?q=flavonoidi&client=firefox-b-ab&dcr=0&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiz1qmb6ZbXAhWBAJoKHa e6AqAQ_AUICigB&biw=1680&bih=913#imgrc=YNlweiX5GLMs6M, (PRISTUPLJENO 19.07.2018.)
6. Knapić J. Utjecaj ekološkog načina proizvodnje na antioksidacijsku aktivnost i organoleptička svojstva vina. *Diplomski rad*. Zagreb; 2016.
7. Hrvatska agencija za hranu, https://www.hah.hr/arhiva/index_potrosacki.php?id=368, (PRISTUPLJENO 20.07.2018.)
8. Karalić H. *Polifenolne tvari u vinu*. *Diplomski rad*. Osijek; 2014.
9. Struktura flavanola, https://www.google.ba/search?client=firefox-b-ab&dcr=0&biw=681&bih=642&tbn=isch&sa=1&ei=u6CWW9PoD4rorgTK1ZnYDg&q=STRUKTURA+FLAVANOLA&oq=STRUKTURA+FLAVANOLA&gs_l=img.3...351041.354854.0.355029.19.16.0.2.2.0.248.1665.0j8j2.10.0...0...1c.1.64.img..7.9.1276...0j0i30k1j0i8i30k1j0i5i30k1.0.zJ1LtIX46q0#imgrc=rkz4LxeOG6ZbSM, (PRISTUPLJENO 10.09.2018.)
10. Moreno J, Peinado R. *Enological Chemistry*. Elsevier; 2012.

11. Struktura neflavonoida <https://repozitorij.pbf.unizg.hr/islandora/object/pbf:71/preview> (PRISTUPLJENO 29.08.2018)
12. Skroza D, Generalić-Mekinić I, Svilović S, Šimat V, Katalinić V. Investigation of the potential synergistic effect of resveratrol with other phenolic compounds: A case of binary phenolic mixtures. *Journal of food composition and analysis*. 2015; 38: 13-18.
13. Aggarwal B.B, Shishodia S. *Resveratrol in Helath Disease*, London, CRC, 2006.
14. Shan B. *Antioxidant and antimicrobial capacities of spices and medicinal herb extracts and their potential application as natural food preservatives*. University of Science and Technology, University of Hong Kong; 2008.
15. Cojocarú GA., Antoce AO. Influence of fermentor type on polyphenol extraction in red wines produced Cabernet sauvignon. *Scientific Papers. Series B, Horticulture*. 2017; LXI: 249-256.
16. Tehnologija hrane; Tehnologija proizvodnje vina <https://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/tehnologija-proizvodnje-vina>, (PRISTUPLJENO 13.08.2018.)
17. Generalić I, Skroza D, Katalinić V. *Prerada grožđa- Skripta za vježbe*. Split; 2010.
18. Tomas D, Kolovrat D. *Priručnik za proizvodnju vina- za male proizvođače i hobiste*. Mostar; 2011.
19. Gomez-Plaza E, Gill-Munoz R, Lopez-Roca J.M, Martinez-Cutillas A. Effects of the time of SO₂ addition on phenolic compounds in wine. *Vitis –Geilweilerhof*. 2001
20. Tenore GC, Basile A, Novellino E. Antioxidant and antimicrobial properties of polyphenolic extracts from selected Moroccan red wines. *Journal of Food Science*. 2011; 76(9):C1342-8.
21. Aleksandra N. Radovanović. *Karakterizacija i korelacija bioaktivnih fenolnih jedinjenja crvenih vina Balkana i njihova antioksidaciona i antimikrobna svojstva*, Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, 2014.

22. Papadopoulou C, Soulti K, Roussis IG. Potential antimicrobial activity of red and white wine phenolic extracts against strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. Food Technology and Biotechnology. 2005; 3(1): 41–46.
23. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids-An overview. The Scientific World Journal. 2013; Article ID 162750, 16 stranica.
24. Katalinić V, Smole Možina S, Generalić I, Skroza D, Ljubenković I, Klančnik A. Phenolic profile, antioxidant capacity and antimicrobial activity of crude leaf extracts of six *Vitis vinifera* L. varieties. International journal of food properties. 2013; 16(1): 45-60.
25. Radovanović AN, Jovančević BS, Radovanović BC, Mihajlov-Krstev T. Antimicrobial effectiveness of selected Vranac wines against six Gram-positive and six Gram-negative bacterial strains. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 2014; 13(5).
26. Katalinić V, Smole Možina S, Skroza D, Generalić I, Abramović H, Miloš M, Ljubenković I, Piskernik S, Pezo I, Terpinč P, Boban M. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia. Food Chemistry. 2010; 119: 715-723.
27. Campbell-Plat Geoffrey. Food Science and Technology. A John Wiley & Sons. 2009
28. Magdalenić B. Značaj nalaza *Listeria monocytogenes* u mlijeku i mliječnim proizvodima. Izlaganje sa znanstvenog skupa. Prehrambeno-biotehnološki fakultet. Zagreb; 1993.
29. Watson S. Enterococcus Faecalis; Medically reviewed by Cho-Dorado. 2017. Dostupno na: <https://www.healthline.com/health/enterococcus-faecalis>
30. Vinopedija http://www.vinopedia.hr/wiki/index.php?title=plavac_mali_crni (PRISTUPLJENO 29.08.2018.)
31. Vinopedija <http://vinopedia.hr/wiki/index.php?title=gra%C5%A1evina> (PRISTUPLJENO: 29.08.2018.)
32. Begonja A. Utjecaj tehnološkog postupka produžene maceracije na antimikrobni učinak bijelog vina. Diplomski rad, Medicinski fakultet, Split; 2017.

33. Skroza D. Učinak odabranih fenolnih spojeva na antioksidacijsku i antimikrobnu aktivnost resveatrola u binarnim fenolnim smjesama. Doktorska disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb; 2015.
34. Klančnik A, Piskernik S, Jeršek B, Smole Možina S. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*. 2010; 81: 121-126.
35. Balour M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity. A review in *Journal of Pharmaceutical*. 2015; 6: 71-79.
36. Koohsari H, Ghaemi EA, Shesh Poli MS, Sadegh A. Evaluation of antibacterial activity of Lemon verbena (*Lippiacitriodora*) leaves. *Ascholars Research Library*. USA; 2013. Dostupno na: www.scholarsresearchlibrary.com.
37. Maksimović Z, Rifatbegović M. Osnovni principi kliničke bakteriologije. Veterinarski fakultet Sarajevo; 2015.