

# Utjecaj tehnološkog postupka produžene maceracije na antimikrobni učinak bijelog vina

---

**Begonja, Ante**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2017**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:566408>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-13**

*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
KEMIJSKO TEHNOLOŠKI FAKULTET  
I  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ante Begonja**

**Utjecaj tehnološkog postupka produžene maceracije  
na antimikrobni učinak bijelog vina**

**Diplomski rad**

**Akadska godina 2016./2017.**

**Mentorica: doc. dr. sc. Ivana Mudnić**

**Split, listopad, 2017. godine**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

### DIPLOMSKI RAD

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

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

#### Utjecaj tehnološkog postupka produžene maceracije na antimikrobni učinak bijelog vina

Ante Begonja, broj indeksa 73

**Cilj:** Ciljevi ovog istraživanja su: ispitati antimikrobni učinak maceriranog bijelog vina protiv bakterije *E. coli* i *S. enterica*, serovar *Enteritidis*; usporediti antimikrobni učinak maceriranog i standardnog bijelog vina te utvrditi utječe li tehnološki postupak produžene maceracije na antimikrobni učinak bijelog vina; utvrditi povezanost sadržaja ukupnih fenola i fenolnog sastava s antimikrobnim učincima vina.

**Materijali i metode:** Sadržaj i sastav ukupnih fenola određen je spektrofotometrijskim metodama. Antioksidacijski učinci mjereni su FRAP (engl. Ferric reducing antioxidant power) metodom, a enološki fizikalno-kemijski parametri standardnim enološkim metodama. Antimikrobni učinak ispitan je inokulacijom bakterijskih suspenzija s vinom na ploče s krvim agarom u unaprijed određenim vremenskim razmacima, u duplikatu. Nakon 24-satne inkubacije vizualno se vršila detekcija bakterijskih kolonija, do pronalaska ploče s izostankom vidljivog porasta.

**Rezultati:** Koncentracija ukupnih fenola bila je gotovo deset puta, a flavonoida više od nekoliko stotina puta manje u standardnom vinu u odnosu na uzorak maceriranog bijelog vina. Sukladno tome, macerirano bijelo vino ostvarilo je i snažniji antioksidacijski učinak. S druge strane macerirano je vino ostvarilo slabiji antibakterijski učinak protiv obje bakterijske vrste s vremenom inkubacije koje je bilo različito za svaku kombinaciju uzorka vina i bakterijske vrste.

**Zaključci:** Tehnološki postupak produžene maceracije rezultirao je vinom bogatijeg ukupnog fenolnog, flavonoidnog i ne-flavonoidnog sadržaja te snažnijeg antioksidacijskog djelovanja. Macerirano bijelo vino proizvedeno tehnološkim postupkom produžene maceracije ostvarilo je antibakterijski učinak protiv *E. coli* i *S. enterica*, serovar *Enteritidis*. Antimikrobni učinak maceriranog vina bio je slabiji u odnosu na učinak standardnog vina.

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

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

**Rad sadrži:** 47 stranica, 10 slika, 7 tablica, 81 literaturnu referencu

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

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

**Datum obrane:** 6. rujna 2017.

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

### GRADUATE THESIS

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

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

**The influence of prolonged maceration as technological process on the antimicrobial effect of white wine**  
Ante Begonja, index number 73

**The research goal:** The aims of this study were to examine the antimicrobial effect of macerated white wine against *E. coli* and *S. enterica*, serovar *Enteritidis*; compare the antimicrobial effect of macerated and standard white wines and determine whether the technological process of prolonged maceration affects the antimicrobial activity of white wine; to establish the correlation between total phenol and phenolic content with the antimicrobial effects of wine.

**Materials and Methods:** The content and composition of the total phenols is determined spectrophotometrically. Antioxidant effects were measured by FRAP (Ferric reducing antioxidant power) method, and enological physical- chemical parameters by standard enological methods. The antimicrobial effect was investigated by inoculation of bacterial suspensions with wine on blood agar plates at predetermined time intervals, in duplicate. After 24-hour incubation, visualization of bacterial colonies was performed until the plate with no apparent bacterial growth was found.

**Results:** Concentration of total phenol was almost ten times, and flavonoids over several hundred times less in the standard wine sample in comparison to the macerated one. Accordingly, macerated wine has a stronger antioxidant effect. On the other hand, the macerated wine had a lower antibacterial effect against both bacterial species with incubation time that was different for each combination of wine and bacterial species.

**Conclusions:** The technological process of extended maceration resulted in a wine of richer total phenol, flavonoid and non-flavonoid content and stronger antioxidant activity. The macerated white wine produced by the technological process of prolonged maceration showed antibacterial effect against *E. coli* and *S. enterica*, serovar *Enteritidis*. The antimicrobial effect of macerated wine was weaker than the effect of standard wine.

**This work was supported by Croatian Science Foundation (HRZZ), project 8652 „Biological Effects of Wine: The Influence of Vinification Technology, Dealcoholization and Aging of Wine“, project leader prof. Mladen Boban.**

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

**Thesis contains:** 47 pages, 10 figures, 7 tables, 81 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

- |                                                   |             |
|---------------------------------------------------|-------------|
| 1. Mladen Boban – PhD, full professor             | chairperson |
| 2. Vedrana Čikeš Čulić – PhD, associate professor | member      |
| 3. Ivana Mudnić – PhD, assistant professor        | supervisor  |

**Defence date:** October 6, 2017.

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

## Sadržaj:

1. UVOD .....	4
1.1. Vino.....	5
1.1.1. Graševina .....	6
1.1.2. Postupak proizvodnje vina .....	7
1.1.3. Fenoli u vinu .....	10
1.2. Bakterije kao potencijalni uzročnici hranom prenosivih infekcija .....	12
1.2.1. <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ).....	12
1.2.2. <i>Salmonella enterica</i> , serovar <i>Enteritidis</i> ( <i>S. enterica</i> ).....	13
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	16
3. MATERIJALI I METODE .....	18
3.1. Priprema vina za uzorak .....	19
3.2. Biokemijska analiza ispitivanih vina .....	19
3.2.1. Enološka analiza .....	20
3.2.2. Analiza sadržaja fenola .....	20
3.2.3. Antioksidacijski kapacitet .....	21
3.2.4. Reagensi i kemikalije .....	21
3.3. Mikrobiološka analiza.....	22
3.4. Statistička analiza .....	23
4. REZULTATI.....	24
4.1. Biokemijska ispitivanja .....	25
4.2. Antibakterijska aktivnost vina .....	26
5. RASPRAVA.....	31
6. ZAKLJUČAK.....	35
7. LITERATURA.....	37
8. SAŽETAK.....	42
9. SUMMARY .....	44
10. ŽIVOTOPIS.....	46

**Zahvale**

Srdačno zahvaljujem docentici Ivani Mudnić i asistentici Miji Grgi na pruženoj potpori i pomoći prilikom izrade diplomskog rada.

Velika zahvala svim članovima obitelji, prijateljima, kolegama i ostalim posebnim ljudima u mom životu.

Posebno zahvaljujem majci na neizmjerneoj ljubavi i podršci koja me pratila tijekom cijelog života.

Ovo ne bi bilo moguće bez vas.

## **1. UVOD**



Više je epidemioloških studija pokazalo kako umjerena konzumacija vina posreduje različite povoljne biološke učinke (1-5). Jedan od važnih bioloških učinaka je i antimikrobni učinak vina, koji je pokazan *in vitro* (2-5) i *in vivo* (1) studijama, i to, kako za intaktno vino, tako i za pojedine sastojke vina (6).

Nadalje, poznato je da način uzgoja vinove loze i primjena različitih tehnoloških postupaka u procesuiranju grožđa i proizvodnji vina značajno utječe na biokemijski sastav i organoleptička svojstva vina. Vrijeme maceracije posebno je značajno zbog dodira mošta s biljnim materijalom (pokožicama i sjemenkama grožđa) u kojem polifenolni spojevi u prisutnosti sve više koncentracije etanola prelaze u vino i ostvaruju važnu ulogu u njegovom zrenju i stabilnosti. Bijelo se vino uobičajeno proizvodi bez maceracije te je siromašno polifenolima u usporedbi s crnim vinom. Primjenom postupka makar i kratke maceracije, polifenolni sastav se povećava.

U ovoj smo studiji istraživali i uspoređivali antibakterijske učinke bijelih vina proizvedenih standardnim tehnološkim postupkom i postupkom produljene maceracije tijekom više mjeseci. Korišteno je bijelo vino Graševina koje je najraširenije u kontinentalnom dijelu Hrvatske, a antibakterijski učinak je ispitan na dvije patogene bakterije: *Escherichia coli* i *Salmonella enterica*, serovar *Enteritidis*.

## 1.1. Vino

Vino (lat. *vinum*), poljoprivredni je prehrambeni proizvod, dobiven potpunim ili djelomičnim alkoholnim vrenjem masulja ili mošta, od svježeg i za preradu u vino pogodnoga grožđa (7). Osim od grožđa, vina se mogu proizvoditi i od riže, kao i od različitih voća (šljiva, trešnja, šipak i slanica). Kvasnice vrše pretvorbu grožđanog šećera (glukoze) u etanol i ugljični dioksid. Primjenom različitih sorti grožđa i sojeva kvasaca proizvode se različite sorte vina. Ove varijacije proizlaze iz složenih interakcija biokemijskog razvoja grožđa, reakcija uključenih u fermentaciju, okolišnih čimbenika i proizvodnog procesa (8).

Vino se proizvodi već tisućama godina. Najraniji poznati tragovi vina su na području Gruzije (Kavkaz) u Euroaziji, gdje su pronađeni posude za vino stare 8000 godina (9). Vino je stiglo na Balkan 4500. god. prije Krista i konzumiralo se na području stare Grčke, Trakije i Rima (10). Tijekom povijesti vina se konzumiralo zbog svojih užitnosti, ali se koristi i u religijskim obredima, kulinarstvu i u zdravstvene svrhe.

Vinski su podrumi posebno projektirana mjesta za skladištenje i dozrijevanje vina. U aktivnom vinskom podrumu, temperatura i vlažnost održavaju se sustavom klimatizacijskih uređaja. Pasivni vinski podrumi nisu klimatski kontrolirani i stoga je potrebno voditi računa o njihovom smještaju. Budući da je vino prirodni, propadljiv prehrambeni proizvod, sve se vrste mogu pokvariti

ukoliko su izložene toplini (11), svjetlu (12), vibracijama (13) ili promjenama temperature (14) i vlažnosti (15). Kada se pravilno pohranjuju, vina mogu održati svoju kvalitetu i u nekim slučajevima starenjem poboljšati aromu i okus.



**Slika 1.**Vino i grožđe.

Dostupno na: <https://thumbs.dreamstime.com/z/white-wine-bottle-vine-glass-bunch-grapes-22685028.jpg>.

Citirano 2017 Jul 20.

### **1.1.1.Graševina**

Kao što je ranije spomenuto, primjenom različitih sorti grožđa, dobivaju se različite sorte vina. Po boji vina se dijele na bijela, ružičasta (rose, opolo) i crna (crvena) (7). Tijekom izrade diplomskog rada korišteno je bijelo vino.

Bijelo vino može biti slamnate, žuto-zelene ili zlatne boje (16). Fermentacijom neobojane pulpe grožđa proizvodi se bijelo vino. Grožđe iz koje se proizvodi bijelo vino obično je zelene ili žute boje. Bijela su vina najčešće suha. Dobivaju se potpunom fermentacijom grožđanog soka. Slatka vina proizvode se nepotpunom fermentacijom, čime zaostaje udio šećera u smjesi. Pjenušava vina (uglavnom bijela vina) proizvode se sprječavanjem ispusta ugljičnog dioksida iz smjese prilikom fermentacije, koja se odvija u boci. Poznate su brojne sorte, kao što su Chardonnay, Sauvignon, Pošip, Graševina i dr. Brojna bijela vina nastaju miješanjem različitih vrsta grožđa (17). U izradi ovog diplomskog rada korištena je Graševina.

Graševina je bijela sorta grožđa i istoimenog vina. Pretpostavlja se da je podrijetlom iz srednje Europe (18). VINO Graševina najčešće je žute boje, izraženog mirisa, suho, srednjeg sadržaja alkohola i ekstrakta koja sadrži cvjetnu aromu i visoku kiselost. Grožđe Graševine koristi se za proizvodnju suhog, poluslatkog, slatkog i pjenušavog bijelog vina (19).

U procesu proizvodnje vina (vinifikacija), potrebno je pažljivo rukovanje grožđem tijekom berbe kako bi se izbjeglo drobljenje pokožice. Često je potrebno hlađenje u različitim koracima vinifikacije. To uključuje hlađenje neposredno nakon branja, kako bi se sačuvao okus, te nakon što se strojno iscijedi sadržaj grožđa, a prije same fermentacije. Tijekom fermentacije vino se hladi u spremnicima od nehrđajućeg čelika na temperaturi od 10 do 18 ° C (17).

Za razliku od nekih drugih sorti, npr. Chardonnaya, većina Graševina ne podliježe malolaktičkoj fermentaciji. To pomaže očuvati kisela obilježje vina. Nakon proizvodnje, često se pohranjuje na temperaturi koja je malo iznad temperature smrzavanja, čime se potiče kristalizacija tartarne (vinske) kiseline. Naknadno se ponovno filtrira kako bi se uklonili preostali kvasci ili onečišćenja (17).



**Slika 2.** Graševina i bijelo grožđe.

Dostupno na: [https://c1.staticflickr.com/3/2722/5805661921\\_b810c108ca\\_b.jpg](https://c1.staticflickr.com/3/2722/5805661921_b810c108ca_b.jpg). Citirano 2017 Jul 20.

## **1.1.2. Postupak proizvodnje vina**

### **1.1.2.1. Fermentacija**

Fermentacija je metabolički proces pretvorbe šećera u kiseline, plinove ili alkohol. Pojavljuje se kod kvasaca i bakterija, ali i u mišićnim stanicama osiromašenima kisikom pri čemu se stvara mliječna kiselina. Fermentacija se također često koristi kao pojam za uzgoj mikroorganizama na

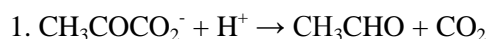
mediju s ciljem proizvodnje određenog kemijskog produkta. Velike spoznaje na ovom području donio je mikrobiolog Louis Pasteur (8).

Fermentacija se kao kemijska reakcija odvija kad je lanac elektronskog transporta neupotrebljiv (često zbog nedostatka konačnog akceptora elektrona, kao što je kisik). U tom slučaju fermentacija postaje primarni izvor ATP-a (energijom bogatog spoja koji se koristi kao glavni izvor energije u velikom broju fizioloških i metaboličkih procesa). Kod anaerobnih mikroorganizama fermentacija je uvijek glavni izvor energije (8).

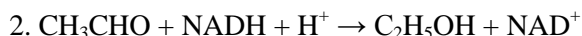
Prvi korak Embden-Meyerhof-Parnasove glikolize uobičajen je za mnoge fermentacijske puteve, pri čemu iz glukoze,  $C_6H_{12}O_6$ , nastaju dvije molekule piruvata,  $CH_3COCO_2^-$ :



Piruvat se potom prevodi u etanol i ugljikov dioksid u dva koraka, regenerirajući oksidirani  $NAD^+$  potreban za glikolizu:



Reakcija je katalizirana piruvat-dekarboksilazom.

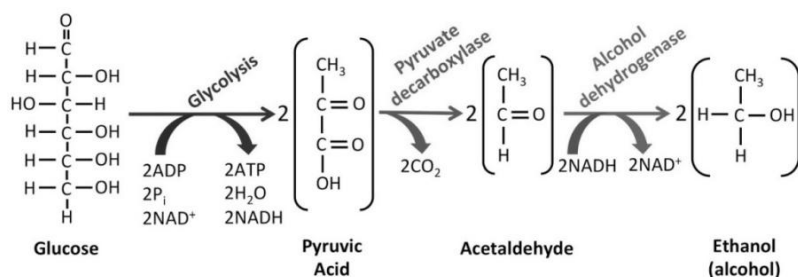


Reakcija je katalizirana alkohol-dehidrogenazom (20).

Konačna skaćena kemijska jednadžba u nastavku prikazuje alkoholnu fermentaciju glukoze. Jedna molekula glukoze prelazi u dvije molekule etanola,  $C_2H_5OH$ , i dvije molekule ugljičnog dioksida,  $CO_2$ :



Ljudi koriste fermentaciju za proizvodnju pića i hrane. Koristi se u procesu proizvodnje mliječne kiseline u kiseloj hrani, kao što su ukiseljeni krastavci i jogurt, te za proizvodnju alkoholnih pića, kao što su vino i pivo. Fermentacija se čak može pojaviti u želucu sisavaca, uključujući i ljude (8).



Slika 3. Fermentacijski lanac.

### 1.1.2.2. Maceracija

Maceracija je tehnološki postupak proizvodnje crnog vina u kojem se fenolni spojevi grožđa – tanini, pigmenti (antocijanini) i ostali spojevi koji značajno doprinose okusu vina otpuštaju iz pokožice plodova, sjemenki i stabljike u mošt. Prilikom maceracije dolazi do namakanja čvrstih i polučvrstih dijelova biljke u tekućem mediju (najprije moštu, a potom vinu), čime crno vino dobiva svoju karakterističnu tamnocrvenu boju.

Postupak maceracije započinje čim se razbije opna grožđa i smjesa se izloži izvoru topline. Iskoristivost postupka je funkcija temperature; više temperature pogoduju raspadanju materijala i ekstrakciji fenola iz pokožice i drugih grožđanih materijala. Maceracija se nastavlja tijekom fermentacijskog razdoblja, a može se nastaviti i nakon završetka fermentacije. Proces je spor i dugotrajan zbog spore ekstrakcije pojedinih komponenti, poput antocijanina, u vinu. Izlaganje smjese višim temperaturama i višim razinama alkohola može ubrzati proces jer alkohol djeluje kao ekstrakcijsko otapalo. Navedeni proces postiže maksimum nakon što se u vinu postigne sadržaj alkohola od 10 volumnih %.

Ugljični dioksid (CO<sub>2</sub>) oslobađa se kao nusproizvod fermentacije. Nastali ugljični dioksid je manje gustoće od okolne smjese pa putuju prema površini, noseći sa sobom dijelove grožđa. Posljedica toga je da nastaje film grožđanog materijala na površini koji ima malu dodirnu površinu s ostatkom smjese. Potrebno je miješati smjesu opremom ili tradicionalnom metodom trljanja nogama („gaženje“ grožđa). Ovaj proces često se vrši tijekom fermentacije, ovisno o stupnju maceracije koja se želi postići.

Ovisno o sorti, proces maceracije može pomoći u postizanju brojnih aroma i okusa koje se inače ne bi mogle proizvesti. Utječe na okus, uključujući i intenzitet okusa grožđa i alkohola, te intenzivira boju. Veća ekstrakcija može povećati složenosti rok trajanja vina stvaranjem složenijih tanina koji će se polagano ublažavati s vremenom. Problem kod maceriranih vina može biti razvoj hlapljivih kiselina. Također, dugotrajna maceracija može prejako intenzivirati okus, zbog čega može biti odbojan velikom broju ljudi.

Prilikom proizvodnje bijelih vina, maceracija se u pravilu pokušava izbjeći ili svesti na minimum. Ipak, u Hrvatskoj je u zadnje vrijeme oživjela tradicija proizvodnje maceriranih bijelih vina, poznatih i pod nazivom narančasta ili jantarna vina. Tehnologija maceracije bijelog grožđa stara je nekoliko tisuća godina, a potječe iz Gruzije, gdje se dugotrajna maceracija provodila u velikim zemljanim amforama, tzv. kvevri. Kvevri su se izolirale pčelinjim voskom i najčešće bile ukopane u tlu ili ugrađene u podove vinskih podruma, a u njim se vršila fermentacija grožđanoga soka s biljnim materijalom uključujući često i peteljke. Nakon fermentacije amfora se hermetički zatvarala hrastovim

poklopcem i glinom. Nakon 5-6 mjeseci vršila se filtracija, a vino se vraćalo natrag u amfore ili velike drvene bačve, na dugo dozrijevanje (do 2 godine) uz povremeno miješanje. U Gruziji se i danas proizvodi macerirano bijelo vino, pri čemu se vino stabilizira i zrije u amforama (ili drvenim bačvama) oko 4 godine, uz redovno pretakanje i čuvanje bez doticaja sa zrakom (77). 90-ih godina prošlog stoljeća proizvodnju jantarnih vina sličnom tehnologijom potaknuli su talijanski proizvođači iz regije Friuli Venezia Giulia. Proizvodnja se iz Italije proširila i na susjedne regije u Sloveniji, Hrvatskoj, a postoji i u Francuskoj, Njemačkoj, Novom Zelandu i Kaliforniji.

Tehnološki postupak produljene maceracije značajno mjenja organoleptička svojstva i biokemijski sastav bijeloga vina. Sadržaj ukupnih fenola u ovim je vinima višestruko veći u odnosu na „obična“ bijela vina (21). Biološki učinci maceriranih bijelih vina prema našim saznanjima do sada nisu istraživani.

### **1.1.3.Fenoli u vinu**

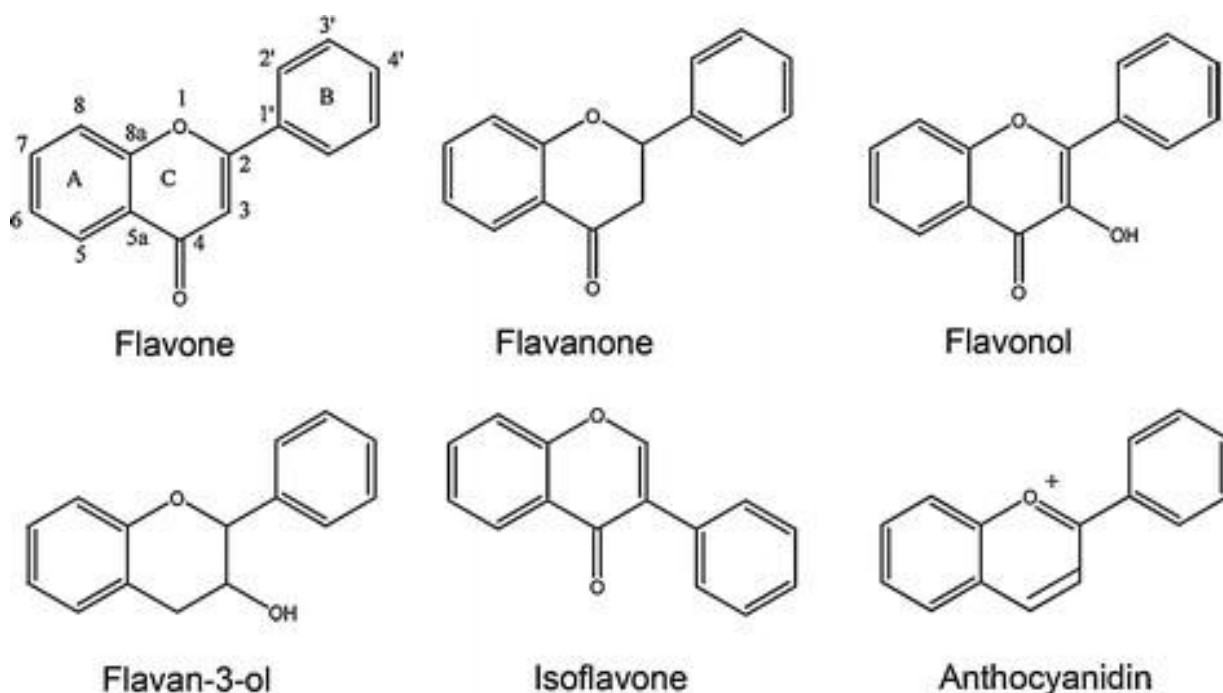
Fenoli su sekundarni biljni metaboliti i jedna od najvećih skupina fitokemikalija koja obuhvaća više od 8000, biološki aktivnih, nenutritivnih spojeva. Fenoli su spojevi koji sadrže aromatski prsten na kojem se nalazi jedna ili više hidroksilnih skupina, zajedno s njihovim funkcionalnim derivatima. Struktura fenola se značajno razlikuje, od jednostavnih monomernih molekula kao što su fenolne kiseline do dugolančanih polimera kao što su tanini. Monofenoli su spojevi koji sadrže jedan fenolni prsten, dok polifenoli sadrže više fenolnih prstenova. Dvije osnovne kemijske skupine su flavonoidi i ne-flavonoidi (22-23). Pokazani su brojni biološki učinci fenola s povoljnim utjecajem na ljudsko zdravlje. Uz izravan vazodilatacijski učinak, ovi spojevi djeluju pozitivno protiv oksidacijskog stresa, važnog patofiziološkog mehanizma vaskularnih i drugih bolesti. U eksperimentalnim uvjetima *in vitro* inhibiraju oksidaciju lipoproteina male gustoće (LDL), a nakon konzumacije nekog jela ili pića koje je bogato polifenolima, primjerice vina, povećava se razina lipoproteina velike gustoće (HDL) i antioksidacijski kapacitet plazme u ljudi (24-26), unatoč dokazane slabe biodostupnosti ovih spojeva (27).

#### **1.1.3.1 Flavonoidi**

Flavonoidi (lat. *flavus* - žut) su najveća skupina fenolnih spojeva. Najčešće se radi o pigmentima žute i crveno-modre boje, a nalaze se u voću, povrću, te napitcima poput vina, kave i čaja. Imaju karakterističnu jezgru od tri aromatska prstena. S benzenskim prstenom A spregnut je heterociklički prsten C koji preko drugog ugljikovog atoma ostvaruje vezu s benzenskim prstenom B (slika 4). Pojedine skupine flavonoida imaju drukčiji prsten C. Stoga razlikujemo flavonoide kojima je prsten C heterociklički piran unutar skupine flavanola ili piron kod skupine flavonola. Antocijanidini

su pigmenti vina i grožđa, a njihov specifičan konjugirani C prsten zaslužan je za plavo ili crveno obojenje. Pritom treba napomenuti da se u prirodi ne pojavljuju u slobodnoj formi, nego kao glikozidi, antocijani (28-31).

U literaturi su poznati *in vitro* antioksidacijski učinci pojedinačnih spojeva ili smjese flavonoida. Opisano je kako flavonoidima bogat ekstrakt sjemenki grožđa ostvaruje značajnu antioksidacijsku sposobnost u *in vivo* studijama u kojima su korišteni štakori štiteći njihovu gastrointestinalnu sluznicu od reaktivnih kisikovih spojeva (ROS, eng. reactive oxygen species) stvorenih akutnim ili kroničnim stresom (32). Međutim, brojna su istraživanja pokazala kako se flavonoidi neznatno apsorbiraju nakon peroralne primjene, čak manje od 5%, od čega se većina brzo metabolizira i izluči, te da je njihova biodostupnost niska (33,34), zbog čega je djelotvornost flavonoida *in vivo* upitna.



**Slika 4.** Strukture flavonoida.

Dostupno na: [http://www.akspublication.com/paper05\\_jul-dec2007/figure1.gif](http://www.akspublication.com/paper05_jul-dec2007/figure1.gif). Citirano 2017 Jul 20.

### 1.1.3.2 Ne-flavonoidi

U ne-flavonoide se ubrajaju fenolne kiseline i stilbeni.

Fenolne kiseline predstavljaju jednostavne fenole koji na benzenskom prstenu imaju najmanje jednu karboksilnu skupinu. Veoma su rasprostranjene u prirodi, a nalazimo ih u različitim dijelovima

biljaka. Prisutne su u slobodnoj formi ili kao glikozilirani derivati i esteri u voću, povrću, žitaricama, vinu te u čaju (34). Snažni su antioksidansi, a u različitim eksperimentalnim uvjetima ostvaruju i vazodilatacijski učinak (35).

Stilbeni su prirodni biljni spojevi nastali kao obrambeni odgovor biljke na UV zračenje, infekcije različitim mikroorganizmima i druge oblike stresa. Najpoznatiji predstavnik ove skupine fenola je resveratrol koji se pojavljuje u dva stereoizomerna oblika: cis-(Z) i trans-(Z). Vjerojatno je i najistraživaniji predstavnik fenolnih spojeva kojemu se pripisuju brojni biološki učinci: antibakterijski (78), antiparazitski (79), antitumorski (80), neuroprotektivni (81), antioksidativni (82) i brojni drugi.

## **1.2. Bakterije kao potencijalni uzročnici hranom prenosivih infekcija**

Hranom prenosive infekcije su uzrokovane konzumiranjem kontaminirane hrane te se ubrajaju u alimentarne infekcije čiji su uzročnici mikroorganizmi ili njihovi toksini koji ulaze u ljudsko tijelo kroz probavni trakt. Ove infekcije dovode do gastroenteritisa što obično uključuje proljev, povraćanje i grčeve u trbuhu. Simptomi počinju uglavnom 12-72 sata nakon prvog kontakta, a obično traju manje od tjedan dana. Uz virusne i parazitske mikroorganizme, uzročnici mogu biti i bakterije poput vrsta iz rodova *Salmonella*, *Shigella* i *Staphylococcus*; te vrste poput *Vibrio cholerae*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* i drugi.

### **1.2.1. *Escherichia coli* (*E. coli*)**

*Escherichia coli*, *Enterobacteriaceae*, je gram-negativni fakultativni anaerobni bacil roda *Escherichia*. Najčešće se nalazi u donjim dijelovima crijeva toplokrvnih organizama (37,38). Stanice su tipično štapičaste, duljine oko 2,0  $\mu\text{m}$  i promjera 0,25-1,0  $\mu\text{m}$ , s volumenom stanica 0,6-0,7  $\mu\text{m}^3$  (39, 40). Većina sojeva je bezopasna, ali neki serovari mogu dovesti do trovanja hranom i povremeno su odgovorne za povlačenje proizvoda zbog kontaminacije hrane (41). Bezopasni sojevi dio su normalne flore crijeva i mogu biti korisni domaćinima proizvodnjom vitamina K2 i sprečavanjem kolonizacije crijeva patogenim bakterijama (42). U okolišu se širi fekalnim sadržajem. Intenzivno raste u svježim fekalijama u aerobnim uvjetima tijekom 3 dana, no brojnost se polako smanjuje nakon tog perioda. *E. coli* i drugi fakultativni anaerobni sastojci čine oko 0,1% crijevne flore (43), a fekalno-oralni prijenos glavni je put kojim patogeni sojevi bakterije uzrokuju bolesti (44).

*E. coli* se boja negativno po Gramu jer joj je stanična stijenka sastavljena od tankog peptidoglikanskog sloja i vanjske membrane. Tijekom tog procesa, *E. coli* se boja safraninom i dobiva



karakterističnu rozu boju. Vanjska membrana koja okružuje staničnu stijenku predstavlja prepreku za određene antibiotike, tako da penicilin ne oštećuje *E. coli* (45).

Uzgaja se na velikom broju broju supstrata. Fermentacijom u anaerobnim uvjetima proizvodi smjesu kiselina, uključujući laktat, sukcinat, etanol, acetat i ugljični dioksid. Budući da mnogi mnogi metabolički putevi u u ovom tipu fermentacije vode do proizvodnje plinovitog vodika, potrebno ga je održavati na niskoj razini kako bi se reakcije i dalje odvijale. Zbog toga *E. coli* često živi u simbiozi s organizmima koji troše vodik, kao što su metanogeni organizmi ili bakterije koje troše sulfate (46).

Optimalni rast *E. coli* odvija se na 37°C, ali neki laboratorijski sojevi mogu rasti i na temperaturama do 49°C (47). *E. coli* raste u različitim definiranim laboratorijskim medijima, kao što je lizogenijev bujon, ili bilo koji medij koji sadrži glukozu, amonijev fosfat, natrijev klorid, magnezijev sulfat, kalijev fosfat i vodu. Rast može biti potaknut aerobnim ili anaerobnim metabolizmom pomoću velikog broja redoks parova, uključujući oksidaciju piruvatne i formijatne kiseline, vodika i aminokiselina, te redukciju supstrata kao što su kisik, nitrat, fumarat, dimetil sulfoksid, i trimetilamin N-oksid (48). Klasificira se kao fakultativni anaerob, odnosno koristi kisik kada je prisutan i dostupan, ali može nastaviti rasti u odsutnosti kisika proizvodnjom energije fermentacijom, anaerobnim metabolizmom. Sposobnost da nastavi rasti u odsutnosti kisika omogućuje preživljavanje u sredinama gdje prevladava voda.

Može se uzgajati lako i jeftino u laboratorijskoj sredini i intenzivno se istražuje već više od 60 godina. *E. coli* je kemoheterotrof čiji medij mora sadržavati izvor ugljika i energije. Radi se o najraširenijem prokariotskom modelu organizma koji je važan u području biotehnologije i mikrobiologije, gdje je se koristi u metodama rekombinantne DNA. U povoljnim uvjetima reproduciraju se unutar 20 minuta (49).

### **1.2.2. *Salmonella enterica*, serovar *Enteritidis* (*S. enterica*)**

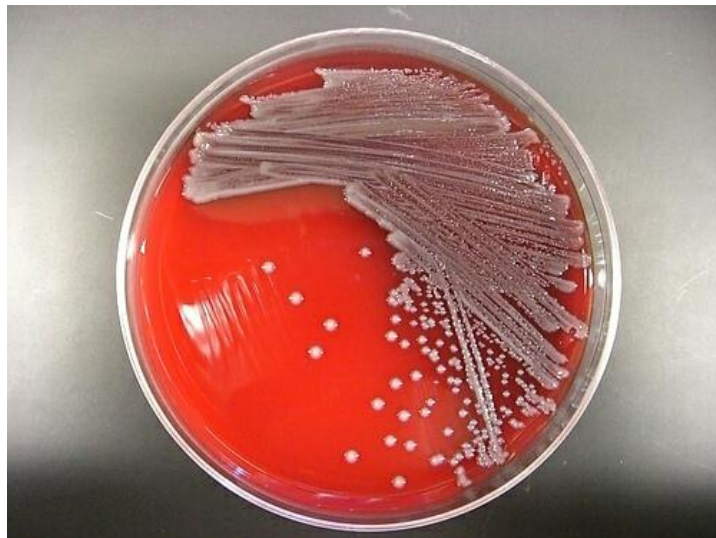
*Salmonella* je rod gram-negativnih bacila iz porodice *Enterobacteriaceae*. U rod *Salmonella* spadaju dvije vrste: *Salmonella enterica* i *Salmonella bongori*. *Salmonella enterica* dalje je podijeljena u šest podvrsta (51) koje obuhvaćaju više od 2500 serovara. *S. enterica* nalazi se u svim toplokrvnim životinjama i u okolišu. *S. bongori* je ograničena na hladnokrvne životinje, osobito gmazove (52). Salmonele se mogu naći u probavnom traktu ljudi i životinja, posebno gmazova. Hrana i voda mogu biti kontaminirane bakterijama ako dođu u kontakt s izmetom zaraženih ljudi ili životinja. Sojevi salmonele uzrokuju bolesti poput tifusne groznice, paratifusne groznice i trovanja hranom (salmoneloza) (53).

Spadaju u skupinu nesporogenih i pretežno pokretnih enterobakterija. Promjer stanica kreće se između 0,7 i 1,5 µm, duljine od 2 do 5 µm, te posjeduju bičeve oko cijelog tijela stanice (54).

Kao i *E. coli*, salmonele su također kemotrofi. Energiju dobivaju oksido-redukcijskim reakcijama iz organskih izvora. Oni su također fakultativni anaerobni, odnosno mogu preživjeti sa ili bez kisika (54). Pretežito obitavaju unutar domaćina, ali mogu opstati nekoliko tjedana nakon kontaminacije u okolišu kupaonice i često su pronađeni izolati iz izvora vode, koji djeluju kao bakterijski rezervoari i mogu olakšati prijenos između domaćina (55).

Većina podvrsta proizvodi vodikov sulfid (56) koji se lako može otkriti uzgojem na mediju koji sadrži željezni sulfat. Također se može otkriti i odrediti korištenjem *Multiplex* (57) ili *Real-time* (58) lančane reakcije polimeraze (PCR) iz ekstrahirane DNA. Neprekidno se nespolno reproducira binarnom diobom s intervalom od 40 minuta (59).

Bakterije se ne uništavaju zamrzavanjem (60, 61), ali UV svjetlost i toplina ubrzavaju njihovo uništavanje. Uništavanje se provodi zagrijavanjem na temperaturi od 55°C u trajanju od 90 minuta, ili na temperaturi od 60°C u trajanju od 12 minuta (62).



**Slika 5.** Bakterijska kultura *E. coli* na krvnom agar.



**Slika 6.** Bakterijska kultura *S. enterice* na krvnom agaru.

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Za razliku od bijelog vina proizvedenog uobičajenim tehnološkim postupkom, čiji su biološki učinci istraživani, biološki učinci, uključujući antimikrobne i antioksidacijske učinke maceriranog bijelog vina nisu do sada istraživani. Stoga je prvi cilj ovog istraživanja ispitati antimikrobni učinak maceriranog bijelog vina protiv bakterije *E. coli* i *S. enterica*, serovar *Enteritidis*, dva česta uzročnika alimentarnih infekcija.

Drugi cilj je usporediti antimikrobni učinak maceriranog i standardnog bijelog vina te utvrditi utječe li tehnološki postupak produljene maceracije na antimikrobni učinak bijelog vina.

Obzirom da tehnologija proizvodnje značajno utječe na kemijski sastav vina, za očekivati je i različite biološke učinke ovih vina. Treći cilj je, stoga, utvrditi povezanost sadržaja ukupnih fenola i fenolnog sastava s antimikrobnim učincima vina.

### **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1.Priprema vina za uzorak

U diplomskom radu koristili su se uzorci standardnog i maceriranog bijelog vina Graševine, vinarije Krauthaker, Kutjevo, berba 2015. godine. Oba su ispitivana vina proizvedena od grožđa iz istog vinograda. Standardno vino proizvedeno je standardnim vinifikacijskim postupkom u kojem je spontana fermentacija groždanog soka izvršena bez maceracije. S druge strane, macerirano je vino proizvedeno postupkom u kojem se spontana fermentacija groždenog soka odvijala u dodiru s biljnim materijalom. Nakon toga su se bez uklanjanja sjemenki i pokožica grožđa, tankovi vina hermetički zatvorili omogućavajući vinu daljnje sazrijevanje pri konstantnoj temperaturi i bez doticaja sa zrakom tijekom 120 dana. Na početku eksperimentalnog rada vino je iz originalne butelje preliveno u manje posude od tamnoga stakla, volumena 100 ml i čuvano u hladnjaku na temperaturi od 4°C. Pri svakom pokusu korištena je nova bočica vina.



Slika 7. Ispitivana vina.

### 3.2.Biokemijska analiza ispitivanih vina

Osim uobičajene enološke analize koja, između ostaloga, uključuje sadržaj alkohola i šećera, kiselost i pH vrijednost vina te sadržaj slobodnog i ukupnog sumporovog dioksida, ispitivani uzorci

vina analizirani su spektrofotometrijskim metodama kako bi se utvrdio sadržaj fenolnih spojeva, flavonoida i ne-flavonoida i antioksidacijski kapacitet.

### **3.2.1. Enološka analiza**

Enološka analiza provedena je u skladu s validiranim metodama po Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis, (2014) International Organization of Vine and Wine, Paris. Sva mjerenja provedena su barem 2 puta u Enološkom laboratoriju Zavoda za jadranske kulture i melioraciju krša.

### **3.2.2. Analiza sadržaja fenola**

#### **3.2.2.1. Određivanje koncentracije ukupnih fenola u uzorcima**

Ukupni sadržaj fenola u uzorku određen je metodom Folin-Ciocalteu; kolorimetrijskom metodom čiji se rezultat izražava kao ekvivalent galne kiseline na litru (GAE/L). Metoda se temelji na oksidaciji fenolnih skupina dodatkom Folin-Ciocalteu reagensa i nastajanju obojenog produkta. Fenolne skupine se oksidiraju do kinona dodatkom smjese molibdofosfatnih i volframfosfatnih aniona koji se reduciraju i daju plavo obojenje. Intenzitet obojenja mjeri se očitavanjem apsorbancije pri valnoj duljini od 765 nm.

Postupak mjerenja: u odmjernu tikvicu od 50 ml doda se 0,5 ml ispitivanog vina, 30 ml H<sub>2</sub>O i 2,5 ml Folin – Ciocalteu reagensa. Nakon jedne minute, u otopinu se doda 7,5 ml 20% otopine natrijevog karbonata (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) i nadopuni destiliranom vodom do oznake od 50 ml. Nakon inkubacije od 2 sata, na sobnoj temperaturi očita se apsorbancija na 765 nm. Dobivene vrijednosti izraze se u ekvivalentima galne kiseline. Baždarni pravac galne kiseline (koncentracija prema apsorbanciji) svakodnevno se izrađuje primjenom standarda galne kiseline (koncentracije 0, 50, 100, 150, 250 i 500 mg/l). Sva su mjerenja provedena primjenom UV-Vis spektrofotometra (Specord 200, Analytik Jena Inc., Jena, Njemačka), opremljenog s držačem sa 6 kiveta i kupelji s termostatom. Podaci su dobiveni nakon 3 mjerenja i prikazani kao srednja vrijednost (64).

#### **3.2.2.2. Određivanje koncentracije flavonoida i ne-flavonoida u uzorcima**

Koncentracija flavonoida i ne-flavonoida izmjerena je nakon precipitacije flavonoida s formaldehidom je metodom po Folin-Ciocalteu. Formaldehid reagira s C-6 ili C-8 u 5,7-dihidroksi



flavonoidu stvarajući metilolderivate koji dalje reagiraju s drugim flavonoidnim spojevima na C-6 ili C-8 položaju. Pri tome nastaju kondenzirane molekule koje se uklone filtriranjem. Ostatak ne-flavonoidnih fenola određuje se po Folin-Ciocalteu metodi za ukupne fenole, kako je ranije opisano. Razlika ukupnih fenola i ne-flavonoida daje količinu flavonoida, prema sljedećem izrazu:

$$\text{Flavonoidi (mg GAE/L)} = \text{Ukupni fenoli (mg GAE/L)} - \text{Ne-flavonoidi (mg GAE/L)}$$

Postupak mjerenja: u tikvicu od 50 ml doda se 5 ml ispitivanog uzorka vina, 5 ml HCl, prethodno razrijeđene u omjeru 1:4 i 2,5 ml otopine formaldehida (8 mg/ml). Otopina se ostavi stajati 24 sata na sobnoj temperaturi nakon čega se filtrira.

### 3.2.3. Antioksidacijski kapacitet

Ukupni antioksidacijski kapacitet uzoraka određen je metodom FRAP (eng. Ferric reducing antioxidant power) (65). U ovoj se metodi antioksidacijski učinak mjeri se kao sposobnost doniranja elektrona od strane antioksidansa. Donirani elektron odgovoran je za redukciju  $\text{Fe}^{3+}$  u  $\text{Fe}^{2+}$  koji se kelira s 2,4,6-tripiridil-s-triazinom (TPTZ), pri čemu nastaje kompleks  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ. Maksimum apsorpcije je na 593 nm. Mjerenja su izvršena u tri ponavljanja. Rezultati su uspoređeni s podacima standardne krivulje s različitim koncentracijama Troloxa, analoga vitamina E, i izražene su u mikromolarnim ekvivalentima Troloxa (TE).

Postupak mjerenja: u kivetu spektrofotometra doda se 2250  $\mu\text{l}$  FRAP reagensa koji se priprema miješanjem 1) 300 mmol/L acetatnog pufera pH 3,6,2) 10 mmol/L TPTZ otopljenog u 40 mmol/L HCl i 3) 20 mmol/L  $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ ; u omjeru 10:1:1 te izmjeri apsorbanca na 593 nm. Nakon toga u kivetu se doda 75  $\mu\text{l}$  ispitivanog vina (razrijeđenog u omjeru 1:10 s  $\text{H}_2\text{O}$ ) i 225  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ . Nakon 4 minute latencije, opet se izmjeri apsorbanca na 593 nm. Dobivene vrijednosti (razlike između apsorbanca u četvrtoj i nultoj minuti) izražavaju se u ekvivalentima Troloksa.

### 3.2.4. Reagensi i kemikalije

Sve kemikalije i reagensi su analitičke kvalitete, a proizvedeni su u: Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, SAD), Aldrich Chemical Co. (Steineheim, Njemačka) i Merck (Darmstadt, Njemačka). Korištena je deionizirana voda (Milli Q) za pripremu svih otopina i reagensa.

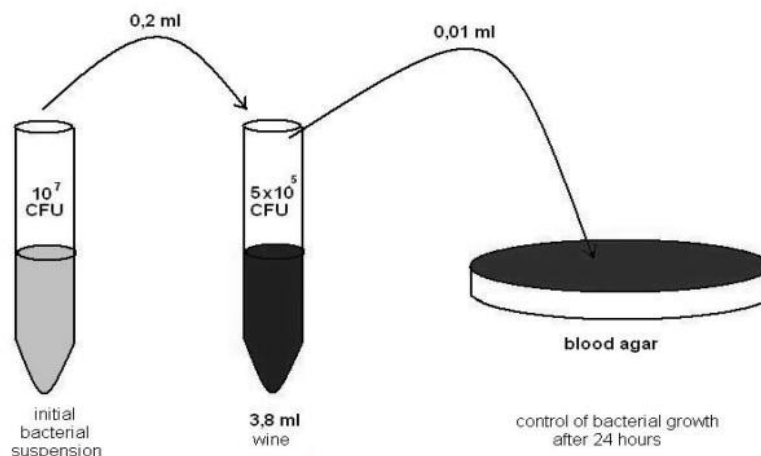
### 3.3. Mikrobiološka analiza

Mikroorganizmi koji su korišteni u ovoj disertaciji standardni su sojevi: *Escherichia coli*, soj 25922 po američkoj klasifikaciji (American Type Culture Collection; ATCC), i *Salmonella enterica*, serovar *Enteritidis*, soj 13076 po američkoj klasifikaciji (ATCC).

*E. coli* korištena u pokusu je serovar O6, biotip 1, a radi se o kliničkom izolatu uzgojenom na triptikaza-soja agaru u aerobnim uvjetima na 37°C. Uzgojeni izolat čuva se na temperaturi od 2 do 8°C. Ispitana je, i dokazana, osjetljivost ovog soja bakterija na antibiotike: cefaleksin, cefaloglicin, kanamicin, cefaloridin, cefalomicin, cefalotin, kloramfenikol, kolistin, kolimicin, gentamicin, nalidiksinska kiselina, neomicin i tetraciklin. Za ispitivanje antibiotiske osjetljivosti koristile su se validirane metode (50).

*S. enterica*, serovar *Enteritidis*, korištena u pokusu, nosi antigenu oznaku I 1,9,12:g,m, a radi se o jednom od antigena koji se koristi za imunizaciju stoke prilikom proizvodnje lijekova za reumatoidni artritis. Uzgojena je na hranjivom agaru u aerobnim uvjetima na 37°C, a uzgojeni izolat čuva se na temperaturi od 2 do 8°C (63).

24-satna bakterijska kultura izolirana je na krvnom agaru s 5% ovčje krvi (Bio-Rad, Hempsted, U.K.) na 35°C na zraku i uvedena u suspenzijski medij (bioMerieux, Marcy l'Étoile, Francuska) s gustoćom od  $10^7$  koloniformnih jedinica (CFU)/mL, što odgovara optičkom turbiditetu od 0,5 McFarlanda. Turbiditet suspenzije određen je Densomatom. Alikvotu bakterijske suspenzije od 200 µL dodano je 3,8 mL ispitivanog uzorka vina. U slijepu probu dodano je 3,8 mL fiziološke otopine umjesto jednakog volumena vina. Početna koncentracija bakterija bila je  $10^5$ - $10^6$  CFU/mL. Slijepa proba provodila se u svakom pokusu kao kontrola bakterijskog porasta. Suspenzija je izmiješana vortex miješalicom i inokulirana kalibriranom ezom (0,01 mL) na krvni agar s 5% ovčje krvi. Ploče su inkubirane 24 sata na temperaturi od 35°C na zraku. Porast bakterija određivao se vizualno, a rezultat je prikazan kao aritmetička sredina rezultata obje ploče za određeno vrijeme. Donji limit detekcije bio je izostanak vidljivog porasta bakterijskih kolonija na ploči. Podaci su prosjek bar neovisna pokusa prikazani kao aritmetička sredina (6).



**Slika 8.** Shema postupka mikrobiološke analize.

### 3.4. Statistička analiza

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

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

Statistička analiza distribucije podataka provjerena je Kolmogorov-Smirnovljevim testom.

Statistička analiza standardnih devijacija provjerena je Bartlettovim testom.

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

Povezanost između nezavisne (vrijeme inkubacije) i zavisne varijable (logaritam broja koloniformnih jedinica u litri) testirana je Pearsonovim testom. Rezultati su prikazani u obliku koeficijenta korelacije i intervala pouzdanosti. Vrijednost  $p < 0,05$  predstavlja granicu statističke značajnosti.

## **4. REZULTATI**

## 4.1. Biokemijska ispitivanja

Enološka analiza vina pokazala je njihovu veliku sličnost u fizikalno-kemijskim parametrima (Tablica 1). Postupak maceracije rezultirao je većom koncentracijom hlapljivih kiselina ( $1,30 \pm 0,12$  g/L *versus*  $0,50 \pm 0,12$  g/L za macerirano i standardno bijelo vino,  $p = 0,0422$ ), ali ukupna kiselost i pH vrijednost obaju vina bila je vrlo slična.

**Tablica 1.** Enološki fizikalno-kemijski parametri vina

	Standardna Graševina	Macerirana Graševina
Relativna gustoća	$0,9928 \pm 0,0003$	$0,9927 \pm 0,0003$
Ukupni alkohol (vol %)	$13,10 \pm 0,25$	$13,00 \pm 0,25$
Stvarni alkohol (vol %)	$13,00 \pm 0,30$	$12,80 \pm 0,30$
Stvarni alkohol (g/L)	$102,30 \pm 1,34$	$101,60 \pm 1,34$
Ukupni suhi ekstrakt (g/L)	$24,80 \pm 1,45$	$24,20 \pm 1,45$
Reducirajući šećeri (g/L)	$4,00 \pm 0,94$	$3,20 \pm 0,94$
Ekstrakt bez šećera (g/L)	$21,80 \pm 1,48$	$22,00 \pm 1,48$
Ekstrakt bez šećera i nehlapive kiselosti (g/L)	$17,50 \pm 1,45$	$18,20 \pm 1,45$
Pepeo (g/L)	$2,59 \pm 0,36$	$3,65 \pm 0,36$
pH-vrijednost	$3,54 \pm 0,12$	$3,90 \pm 0,12$
Ukupna kiselost (izražena kao vinska) (g/L)	$4,90 \pm 0,40$	$5,40 \pm 0,40$
Hlapljiva kiselost (izražena kao octena) (g/L)	$0,50 \pm 0,12^*$	$1,30 \pm 0,12^*$
Nehlapljiva kiselost (izražena kao vinska) (g/L)	$4,30 \pm 0,20$	$3,80 \pm 0,20$
Slobodni SO <sub>2</sub> (mg/L)	$27 \pm 7$	$5 \pm 7$
Ukupni SO <sub>2</sub> (mg/L)	$124 \pm 13$	$99 \pm 13$

Podaci su dobiveni iz najmanje dva nezavisna uzorka i prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ .

Međutim, značajna je razlika u sadržaju ukupnih fenola između standardne i macerirane Graševine. Koncentracija ukupnih fenola u standardnom bijelom vinu iznosila je  $305,30 \pm 3,50$  mg GAE/L, dok je u maceriranom bijelom vinu iznosila  $2850,00 \pm 34,60$  mg GAE/L,  $p < 0,0001$ .

U uzorku standardnog bijelog vina koncentracija flavonoida iznosila je  $2,83 \pm 4,31$  mg GAE/L, što je gotovo 1000 puta manje o odnosu na uzorak maceriranog bijelog vina ( $2476,67 \pm 34,76$  mg GAE/L),  $p < 0,0001$ .

Iako su ispitivani uzorci vina bili međusobno sličniji po koncentraciji ne-flavonoidnih spojeva, ipak je uzorak maceriranog bijelog vina bio bogatiji ovom skupinom fenolnih spojeva ( $373,30 \pm 2,90$  mg GAE/L *versus*  $302,50 \pm 2,50$  mg GAE/L za standardno bijelo vino,  $p < 0,0001$ ).

Sukladno razlikama u koncentraciji ukupnih fenola i flavonoida, očekivana je i razlika u antioksidacijskom kapacitetu ispitivanih vina. Uzorak je maceriranog vina ostvario višestruko bolji antioksidacijski učinak. U standardnom bijelom vinu antioksidacijski potencijal iznosio je  $2,06 \pm 0,14$  TE/L, dok je u maceriranom bijelom vinu iznosio  $12,21 \pm 0,62$  mg GAE/L,  $p < 0,0001$ .

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

	Standardna Graševina	Macerirana Graševina
Ukupni fenoli (mg GAE/L)	$305,30 \pm 3,50^*$	$2850,00 \pm 34,60^*$
Flavonoidi (mg GAE/L)	$2,83 \pm 4,31^*$	$2476,67 \pm 34,76^*$
Neflavonoidi (mg GAE/L)	$302,50 \pm 2,50^*$	$373,30 \pm 2,90^*$
FRAP (mmol TE/L)	$2,06 \pm 0,14^*$	$12,21 \pm 0,62^*$

GAE (eng. *gallic acid equivalent*) – ekvivalent galne kiseline; FRAP (eng. *Ferric reducing antioxidant capacity*); mmol TE/L – milimol utrošenog Trolox po litri. Podaci su dobiveni iz najmanje tri nezavisna uzorka i prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  SD. \* $p < 0,05$  u odnosu s paralelnom vrijednosti za drugo vino predstavlja statistički značajnu razliku.

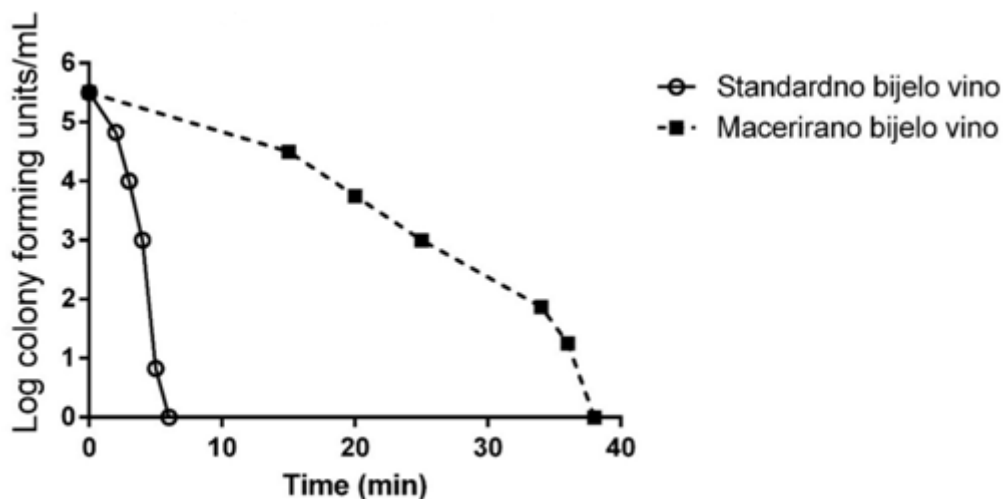
## 4.2. Antibakterijska aktivnost vina

Pokusom je utvrđeno potrebno vrijeme inkubacije u kojem je došlo do potpunog izostanka porasta bakterija.

Antibakterijska aktivnost standardnog bijelog vina bila je relativno snažna i ostvarena je u vremenskom periodu kraćem od 10 min protiv obe bakterije.

Početna bakterijska suspenzija *E. coli* pokazuje potpuni prestanak porasta bakterija nakon 6 minuta doticaja sa standardnim bijelim vinom (Slika 9).

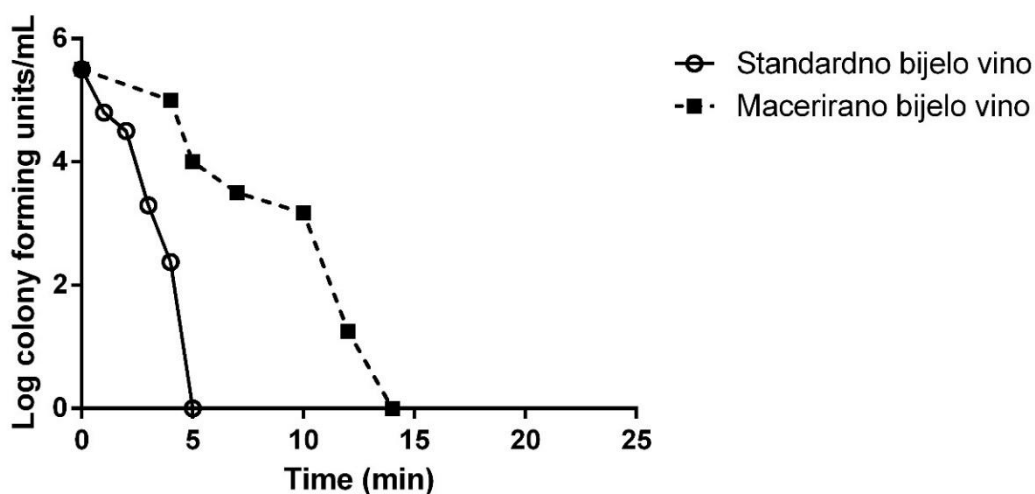
Iznenadujuće, u pokusima s uzorkom maceriranog bijelog vina i bakterijskom suspenzijom *E. coli*, vrijeme inkubacije bilo je više od 6 puta veće, odnosno trebalo je 38 minuta da dođe do potpunog izostanka porasta bakterija na hranjivoj podlozi (Slika 9).



**Slika 9.** Antibakterijska učinkovitost prema *E. coli* ovisna o vremenu inkubacije sa standardnim i maceriranim bijelim vinom. Početne koncentracije od  $10^5$  do  $10^6$  CFU/ml u fiziološkoj otopini korištene su za kontrolu rasta bakterija. Podaci predstavljaju prosjek iz najmanje tri nezavisna mjerenja

Najbolji antibakterijski učinak postiglo je standardno bijelo vino u doticaju s bakterijskom suspenzijom *S. enterica*, serovar *Enteritidis*. Potrebno vrijeme inkubacije iznosilo je samo 5 minuta (Slika 10).

Macerirano je bijelo vino i protiv ove bakterije ostvarilo slabiji antibakterijski učinak. Bilo je potrebno 14 minuta doticaja s vinom da bi došlo do izostanka porasta bakterija na hranjivoj podlozi. (Slika 10).



**Slika 10.** Antibakterijska učinkovitost prema *S. enterica*, serovar *Enteritidis*, ovisna o vremenu inkubacije sa standardnim i maceriranim bijelim vinom. Početne koncentracije od  $10^5$  do  $10^6$  CFU/ml u fiziološkoj otopini korištene su za kontrolu rasta bakterija. Podaci predstavljaju prosjek iz najmanje tri nezavisna mjerenja.

Za pravilnu provedbu statističke analize, bilo je potrebno odrediti razdiobu izmjerenih vrijednosti i sličnost standardnih devijacija. Kolmogorov-Smirnovljev test pokazao je odstupanje izmjerenih vrijednosti od Gaussove razdiobe u gotovo svim kombinacijama vina i bakterija. Rezultati Kolmogorov-Smirnovljevog testa prikazani su u Tablici 3. Bartlettov korigirani statistički koeficijent je 8,909, što ukazuje na veliku vjerojatnost da su standardne devijacije statistički značajno različite. Zbog navedenih rezultata bilo je potrebno odabrati neparametrijsku inačicu jednostrane analize varijance, Kruskal-Wallisov H test s *post-hoc* Dunnovim testom.

**Tablica 3.** Kolmogorov-Smirnovljev test razdiobe dobivenih rezultata o antibakterijskom učinku vina.

	KS
<i>E. coli</i> & Standardno bijelo vino	0,4073
<i>S. enterica</i> , serovar <i>Enteritidis</i> , & Standardno bijelo vino	0,1832*
<i>E. coli</i> & Macerirano bijelo vino	0,3916
<i>S. enterica</i> , serovar <i>Enteritidis</i> , & Macerirano bijelo vino	0,4073

KS – Kolmogorov-Smirnovljev koeficijent. \*p 0,05 predstavlja statistički značajni rezultat.

Za utvrđivanje statistički značajnih razlika između različitih kombinacija bakterija i vina korišten je Kruskal-Wallisov H test s *post-hoc* Dunnovim testom. KW koeficijent korigiran je za ponavljanja. U Kruskal-Wallisovom H test p vrijednost aproksimirana je iz tablice za  $\chi^2$  test jer ispitivane skupine imaju bar jednu vrijednost koja se ponavlja u bar dvije skupine. Rezultati Kruskal-Wallisovog H testa prikazani su u Tablici (4a).



**Tablica 4a.** Kruskal-Wallisov H test statističke značajnosti razlika između svih ispitivanih kombinacija vina i bakterija

	Broj točaka	Zbroj rangova	Prosjeak rangova	Kw
<b>EC/SBV</b>	6	55,00	9,17	21,559*
<b>SE/SBV</b>	6	129,00	21,50	
<b>EC/MBV</b>	6	23,00	3,83	
<b>SE/MBV</b>	6	93,00	15,50	

EC – *Escherichia coli*; SE – *Salmonella enteritidis*; SBV – Standardno bijelo vino; MBV – Macerirano bijelo vino; KW – Kruskal-Wallisov koeficijent. \* $p < 0,05$  predstavlja statistički značajni rezultat.

Rezultat Kruskal-Wallisovog testa prelazi prag signifikantnosti. KW vrijednost je 21,559, pri čemu je  $p < 0,0001$ . Pošto je utvrđeno da postoji barem jedna statistički značajna razlika između ispitivanih skupina, potrebno je provesti *post-hoc* Dunnov test koji je usporedio sve skupine međusobno. Rezultati *post-hoc* Dunnovog testa prikazani su u Tablici 4b.

Premda se naizgled čini da postoji razlika između svih testiranih skupina statistička signifikantnost je izostala. Međutim usporedba rezultata prema vrsti bakterije, pokazuje statistički značajnu razliku između maceriranog i standardnog vina. S druge strane, usporedba prema vrsti vina, ne ukazuje na razlike. Očekivano je pronađena statistički značajna razlika između vremena inkubacije *S. enterice*, serovar *Enteritidis*, u standardnom bijelom vinu i *E. coli* u maceriranom bijelom vinu s koeficijentom 17,667 jer se radi o potpuno različitim kombinacijama vina i bakterija (5 *versus* 38 minuta,  $p < 0,05$ ). Zanimljivo, pronađena je statistički značajna razlika u vremenu inkubacije *E. coli* u standardnom i maceriranom bijelom vinu (6 *versus* 38 minuta,  $p < 0,05$ ) s koeficijentom -12,333, kao i *S. enterica*, serovar *Enteritidis*, u maceriranom i bijelom vinu (5 *versus* 14 minuta,  $p > 0,05$ ) s koeficijentom -11,667.

**Tablica 4b.** Dunnov test statističke značajnosti razlika između svih ispitivanih kombinacija vina i bakterija

	<b>EC/SBV</b>	<b>SE/SBV</b>	<b>EC/MBV</b>	<b>SE/MBV</b>
<b>EC/SBV</b>		5,333	-12,333*	-6,333
<b>SE/SBV</b>	5,333		17,667*	-11,667*
<b>EC/MBV</b>	-12,333*	17,667*		6,000
<b>SE/MBV</b>	-6,333	-11,667*	6,000	

EC – *Escherichia coli*; SE – *Salmonella enterica*, serovar *Enteritidis*; SBV – Standardno bijelo vino; MBV – Macerirano bijelo vino. \* $p < 0,05$  predstavlja statistički značajni rezultat.

Kako bismo utvrdili povezanost antibakterijske aktivnosti upravo s vremenom inkubacije bakterija s vinom, a donekle isključili utjecaj nekih drugih varijabli (primjerice razvoj rezistencije) provedena je statistička analiza povezanosti vremena inkubacije s logaritmom broja koloniformnih jedinica u litri suspenzije. Korelacija ne podrazumijeva kauzalnost, ali ukazuje na to da se promjenom jedne vrijednosti reproducibilno mijenja i druga.

**Tablica 5.** Kolmogorov-Smirnovljev test razdiobe dobivenih vremena inkubacije unutar ispitivane populacije

	KS
<b><i>E. coli</i> &amp; Standardno bijelo vino</b>	0,1738*
<b><i>S. enterica</i>, serovar <i>Enteritidis</i>, &amp; Standardno bijelo vino</b>	0,2058*
<b><i>E. coli</i> &amp; Macerirano bijelo vino</b>	0,1212*
<b><i>S. enterica</i>, serovar <i>Enteritidis</i>, &amp; Maceriranobijelo vino</b>	0,2076*

KS – Kolmogorov-Smirnovljev koeficijent. \*p > 0,05 predstavlja statistički značajni rezultat.

Podaci zadovoljavaju Gaussovu razdiobu u skladu s Kolmogorov-Smirnovljevom testom, zbog čega je odabran Pearsonov test korelacije. Analiza podataka pokazala je statistički izrazito značajnu snažno negativnu linearnu korelaciju za sve ispitivane kombinacije. Ovo ukazuje na visoku povezanost nezavisne i zavisne varijable, odnosno vremena inkubacije i logaritma broja koloniformnih jedinica u litri suspenzije. Rezultati Kolmogorov-Smirnovljevog testa prikazani su u Tablici 5, dok su rezultati Pearsonovog testa prikazani u Tablici 6,

**Tablica 6.** Pearsonov test statističke korelacije između svih ispitivanih kombinacija vina i bakterija

	n	r	95% CI	r <sup>2</sup>
<b>EC/SBV</b>	6	-0,9542*	(-0,9951) - (-0,6322)	0,9105
<b>SE/SBV</b>	6	-0,9567*	(-0,9954) - (-0,6491)	0,9153
<b>EC/MBV</b>	7	-0,9585*	(-0,9941) - (-0,7384)	0,9187
<b>SE/MBV</b>	7	-0,9559*	(-0,9937) - (-0,7237)	0,9137

EC – *Escherichia coli*; SE – *Salmonella enteritidis*; SBV – Standardno bijelo vino; MBV – Macerirano bijelo vino. \*p < 0,05 predstavlja statistički značajni rezultat.

## **5. RASPRAVA**

Povećana prevalencija antibiotske rezistencije zbog pretjerane i neodgovarajuće upotrebe antibiotika dovodi do smanjene učinkovitosti pojedinih antibiotika i potrebe za istraživanjem novih antimikrobnih agensa (66). Liječenje biljnim drogama ili pripravcima dio je tradicionalne pučke medicine koja se u pojedinim kulturama provodi tisućama godina. Kako kvalitetnih znanstvenih dokaza o njihovoj djelotvornosti unatoč dugoj primjeni nedostaje, danas su istraživanja tradicionalnih biljnih pripravaka u porastu.

Vino je kao prehrambeni proizvod sastavni dio mediteranske prehrane. Rezultati provedenog istraživanja o antimikrobnoj aktivnosti bijelog vina ukazuju na razliku u antimikrobnom učinku vina proizvedenih od iste sorte grožđa različitim tehnološkim postupcima, standardne i macerirane Graševine.

Zbog razlike u sastavu različitih uzoraka vina, bilo je potrebno provesti njihovu biokemijsku analizu. Biokemijska sličnost u većini enoloških fizikalno-kemijskih parametara omogućuje međusobnu usporedivost uzoraka, kao i usporedivost s drugim studijama, a biokemijska različitost pokazana u polifenolnom sadržaju i sastavu može upućivati na važnu ulogu ovih spojeva u istraživanoj biološkoj aktivnosti.

Suprotno našim očekivanjima ispitivani uzorak macerirane Graševine nije ostvario bolji antimikrobni učinak od standardne Graševine. Razlike nisu statistički značajne, ali su jasno vidljive. Kako je macerirano vino bogatije fenolima, snažnim *in vitro* antioksidansima (25-27) možemo pretpostaviti kako je jedan od mogućih razloga slabijoj antimikrobnoj aktivnosti maceriranog vina upravo smanjenje oksidacijskih baktericidnih procesa. Ovakva pretpostavka oprečna je drugim radovima u kojima se pokazalo da uklanjanje fenolnih spojeva iz vina uzrokuje smanjenje antimikrobne aktivnosti vina (3, 6, 68). Međutim, u objavljenoj je literaturi pokazana s jedne strane važnost i ne-fenolnih sastavnica vina upravo kao glavnih nosioca antimikrobne aktivnosti (6), i slaba ili nikakva antimikrobna aktivnost fenolnih spojeva (69). Nadalje, iako većina dosadašnjih radova navodi vjerojatnost sinergističkog učinka između pojedinih kemotipskih sastavnica vina (6, 70, 71) ne postoje studije kojima se testira mogućnost njihovog antagonističkog djelovanja.

Ne može se jednostrano zaključiti o utjecaju fenolnih spojeva na antimikrobnu aktivnost. Polifenoli su izrazito osjetljivi na promjene fizikalno-kemijskih parametre u mediju, što se očituje kroz njihovu topljivost, taloženje i interakcije s proteinima (72-74). Nadalje, njihova je aktivnost ovisna o polarnosti medija, što se očituje većom antimikrobnom aktivnosti fenolnih spojeva u mediju manje polarnosti, npr. etanolu (69, 75).

Odavno su poznati antimikrobni učinci etanola. Zbog njegovog antimikrobnog učinka koristi se kao antiseptik u 70%-tnoj volumnoj koncentraciji, pri kojoj ostvaruje maksimalni antimikrobni učinak (74). Međutim, ne samo da je koncentracija etanola u ispitivanim vinima bila značajno niža

od 70%-tne, u drugim studijama pokazano je da etanolne frakcije vina imaju nisku antimikrobnu aktivnost (6).

Dodatni parametri koji potiču antimikrobnu aktivnost mogli bi biti sumporov (IV) oksid i niska pH vrijednost (6). Enološkim ispitivanjima i statističkom analizom nije utvrđeno postojanje razlika u navedenim parametrima. Važno je uzeti u obzir da postoji statistički značajna razlika u hlapljivoj kiselosti između standardne i macerirane Graševine, a da je pritom ukupna kiselost i pH oba vina vrlo sličan. Ovo potencijalno ukazuje na stvaranje octene kiseline, glavnog hlapljivog nusproizvoda u maceriranom vinu što može doprinijeti njegovom smanjenom antimikrobnom učinku i to ne zbog promjena u ukupnoj kiselosti već nekim drugim mehanizmom, primjerice povećanjem polarnosti medija (69, 75).

Provedenim istraživanjem utvrdila su se četiri karakteristična vremena inkubacije bakterijske suspenzije s otopinom vina da bi došlo do prestanka porasta bakterija; po jedno za svaku od ispitivanih kombinacija vina i bakterija. Rezultati su u skladu sa studijama koje su koristile sličnu metodologiju za druge kombinacije vina i bakterija, te su međusobno usporedive (1-6, 68, 71). Snažna negativna linearna korelacija između vremena inkubacije i logaritma broja koloniformnih jedinica u mililitru suspenzije za sve kombinacije vina i bakterija predstavlja svojevrsnu potvrdu pravilno odabran metode za testiranje antimikrobnog učinka.

Zanimljivo je kako su pronađene statistički značajne razlike između gotovo svih kombinacija koje su koristile različito vino, ali nijedna između kombinacija koje su koristile isto vino, a različite bakterije. Ovo ukazuje na malu vjerojatnost potencijalne bakterijske rezistencije kao jednoga od razloga slabijeg antimikrobnog učinak macerirane Graševine.

Uzevši sve u obzir, rezultati potvrđuju da se antimikrobni učinak složenih otopina, kao što je vino, ne može pripisati samo jednom spoju. Antimikrobni je učinak vina rezultat interakcija različitih spojeva (6, 70, 71), kao što je pokazano i za njegove druge biološke učinke u različitim eksperimentalnim uvjetima (25, 64, 72).

Dobiveni rezultati mogli bi predstavljati poticaj budućim istraživanjima antimikrobnog učinka vina, na više sojeva bakterija. Uz to je potrebno dodatno istražiti mehanizme antimikrobnog učinka polifenola kako bi se razjasnila njihova uloga u antimikrobnom učinku vina. Važnost provedenog istraživanja je i u tome što je pokazano da vino snažnijeg antioksidacijskog učinka ostvaruje slabiju antimikrobnu aktivnost. Osim zdravstvenog značaja, ovo je važno i stoga što se u prehrambenoj tehnologiji daje veliki značaj upravo antioksidacijskoj aktivnosti namirnica, iako je često nejasno koji je značaj tog učinka nakon unosa namirnica u organizam.

S obzirom na činjenicu da je antimikrobna rezistencija u porastu, dobiveni rezultati mogu biti značajni i s epidemiološkog aspekta. Važno je naglasiti da se rezultati *in vitro* studija ne smiju

generalizirati i prenijeti na *in vivo* biološke sustave, ali također i da se iz *in vitro* ispitivanja mogu dobiti dobre pretpostavke posebice o lokalnom djelovanju vina i njegovih sastavnica.

## **6. ZAKLJUČAK**

Tehnološki postupak produljene maceracije rezultirao je vinom bogatijeg ukupnog fenolnog, flavonoidnog i ne-flavonoidnog sadržaja te snažnijeg antioksidacijskog djelovanja.

Macerirano bijelo vino proizvedeno tehnološkim postupkom produljene maceracije ostvaruje antibakterijski učinak protiv *E. coli* i *S. enterica*, serovar *Enteritidis*. Antimikrobni učinak maceriranog vina slabiji je u odnosu na učinak standardnog vina. Vrijeme je inkubacije različito za svaku kombinaciju uzorka vina i bakterijske vrste.



## **7. LITERATURA**

1. Weisse ME, Eberly B, Person DA. Wine as a digestive aid: comparative antimicrobial effects of bismuth salicylate and red and white wine. *BMJ* 1995; 311: 1657–60.
2. Sheth NK, Wisniewski TR, Franson TR. Survival of enteric pathogens in common beverages: an *in vitro* study. *Am J Gastroenterol.* 1988; 83: 658–60.
3. Sugita-Konishi Y, Hara-Kudo Y, Iwamoto T, Kondo K. Wine has activity against enteropathogenic bacteria *in vitro* but not *in vivo*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2001; 65: 954–7.
4. Moretro T, Daeschel MA. Wine is bactericidal to foodborne pathogens. *J Food Sci.* 2004; 69: 251–7.
5. Fernandes J, Gomes F, Couto JA, Hogg T. The antimicrobial effect of wine on *Listeria innocua* in a model stomach system. *Food Control.* 2007;18: 1477–83.
6. Boban N, Tonkic M, Budimir D, Modun D, Sutlovic D, Punda-Polic V et al. Antimicrobial effects of wine: separating the role of polyphenols, pH, ethanol, and other wine components. *J Food Sci.* 2010 Jun; 75 (5): M322-6.
7. Zakon o vinu [Internet]. Narodne novine; [citirano 2017 Oct 2]. Dostupno na: <https://www.zakon.hr/z/277/Zakon-o-vinu>
8. Spilling M, Wong WM. *Cultures of The World Georgia*. London: Cavendish Square Publishing; 2008; 128.
9. Johnson H: *The Story of Wine*. London: Simon and Schuster; 1989; 82-9.
10. Robinson Jancis, ED. *The Oxford Companion to Wine*. London: Oxford University Press; 2006; 3: 5-7.
11. Stevenson T. *The Sotheby's Wine Encyclopedia*. Dorling Kindersley; 2005; 46.
12. Chung HJ, Son JH, Park EY, Kim EJ, Lim ST. Effect of vibration and storage on some physico-chemical properties of a commercial red wine; *Jour of Food Comp.* 2008 Dec; 8 (21): 655-659.
13. Robinson Jancis, ED. *The Oxford Companion to Wine*. London: Oxford University Press; 2006;3:664.
14. Lichine, Alexis. *Alexis Lichine's Encyclopedia of Wines and Spirits*. London: Cassell & Company Ltd; 1967; 6: 22–24.
15. Savory or Fruity? Understanding Types of White Wine by Color [Internet]. *WINE FOLLY the essential GUIDE TO WINE*; 2012 Feb 27 [citirano 2017 Jul 20]. Dostupno na: <http://winefolly.com/tutorial/white-wines-by-color/>.
16. Clarke O. *The Encyclopedia of Grapes*. Websters International Publishers; 2001; 194.
17. Robinson Jancis, ED. *The Oxford Companion to Wine*. London: Oxford University Press; 2006; 3: 746.
18. Longo R, Blackman JW, Antalick G, Torley PJ, Rogiers SY, Schmidtke LM. Harvesting and blending options for lower alcohol wines: a sensory and chemical investigation. *J Sci Food Agric.* 2017 May 15.
19. Dickinson, JR. *The metabolism and molecular physiology of Saccharomyces cerevisiae*. Philadelphia, PA: Taylor & Francis. 1999; 82-9 .
20. Robinson Jancis, ED. *The Oxford Companion to Wine*. Oxford University Press; 2006; 3: 414–5.
21. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews.* 1998; 59: 317-33.
22. Maestri DM, Nepote V, Lamarque AI, Zygodlo JA. Natural products as antioxidants. *Phytochemistry: advances in research.* 2006; 37: 105-35.
23. Ignat I, Volf I, Popa VI. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* 2011;126:1821-35. Maxwell S, Cruickshank A, Thorpe G. Red wine and antioxidant activity in serum. *Lancet.* 1994; 344 (8916): 193-4.

24. Modun D, Music I, Vukovic J, Brizic I, Katalinic V, Obad A, et al. The increase in human plasma antioxidant capacity after red wine consumption is due to both plasma urate and wine polyphenols. *Atherosclerosis*. 2008; 197 (1): 250-6.
25. Whitehead TP, Robinson D, Allaway S, Syms J, Hale A. Effect of red wine ingestion on the antioxidant capacity of serum. *Clin Chem* 1995; 41 (1): 32-5.
26. Rodríguez Vaquero MJ, Manca de Nadra MC. Growth parameter and viability modifications of *Escherichia coli* by phenolic compounds and argentine wine extracts. *App Biochem and Biotechnol*. 2008; 151: 342-52.
27. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*. 2004; 79 (5): 727-47.
28. Prochazkova D, Bousova I, Wilhelmova N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 84. 2011; 84: 513-23.
29. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev*. 1998; 56 (11): 317-33.
30. Waterhouse AL. Wine phenolics. *Ann N Y Acad Sci*. 2002; 957: 21-36.
31. Bagchi D, Carryl OR, Tran MX, Bagchi M, Garg A, Milnes MM, et al. Acute and chronic stress-induced oxidative gastrointestinal mucosal injury in rats and protection by bismuth subsalicylate. *Molecular and cellular biochemistry*. 1999; 196 (1-2): 109-16.
32. Lotito SB, Frei B. Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon? *Free radical biology & medicine*. 2006; 41 (12): 1727-46.
33. Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free radical biology & medicine*. 2004; 36 (7): 838-49.
34. Suzuki A, Yamamoto M, Jokura H, Fujii A, Tokimitsu I, Hase T, et al. Ferulic acid restores endothelium-dependent vasodilation in aortas of spontaneously hypertensive rats. *American journal of hypertension*. 2007; 20 (5): 508-13.
35. Tenaillon O, Skurnik D, Picard B; Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat. Rev Microbio* 2010; 8 (3): 207–217.
36. Singleton P. *Bacteria in Biology, Biotechnol and Med*. 1999; 5 :444–454.
37. Yu AC, Loo JF, Yu S, Kong SK, Chan TF. Monitoring bacterial growth using tunable resistive pulse sensing with a pore-based technique. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014; 98 (2): 855–62.
38. Darnton NC, Turner L, Rojevsky S, Berg HC. On torque and tumbling in swimming *Escherichia coli*. *Jou of Bacteriol*. 2007; 189 (5): 1756–64.
39. *Escherichia coli*. [Internet]. CDC National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases. [citirano 2017 Jul 20]. Dostupno na: <http://www.cdc.gov/ecoli/index.html/>.
40. Bentley R, Meganathan R. Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. *Microbiol Rev*. 1982; 46 (3): 241–80.
41. Russell JB, Jarvis GN. Practical mechanisms for interrupting the oral-fecal lifecycle of *Escherichia coli*. *Jou Mol Micro*. 2001; 3 (2): 265–72.
42. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, i sur. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Sci*. 2005 Jun; 308 (5728): 1635–8.
43. Tortora G, Cummings B. *Microbiology: An Introduction*. San Francisco: Pearson. 2010; 85–87, 161, 165.
44. Madigan MT, Martinko JM. *Biology of Microorganisms*. San Francisco: Pearson. 2006; (11).
45. Fotadar U, Zaveloff P, Terracio L. Growth of *Escherichia coli* at elevated temperatures. *Jou of Bas Micro*. 2005; 45 (5): 403–4.
46. Ingledew WJ, Poole RK. The respiratory chains of *Escherichia coli*. *Micro Rev*. 1984 Sep; 48 (3): 222–71.
47. *Microbiology Online* [Internet]. European Microbiology Society; [citirano 2007 Jul 20]. Dostupno na: <http://microbiologyonline.org/about-microbiology/introducing-microbes/bacteria>.

48. *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers (ATCC® 25922-MINI-PACK™) [Internet]. American Type Culture Collection; [citirano 2017 Jul 20]. Dostupno na: <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/25922-MINI-PACK.aspx>.
49. Su, LH; Chiu, CH. Salmonella: clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung Med Jou.* 2007; 30 (3): 210–9.
50. Tortora GA. *Microbiology: An Introduction.* Pearson. 2008; (9): 323–4.
51. Ryan KJ, Ray CG. *Sherris Medical Microbiology.* McGraw Hill. 2004; (4): 362–8.
52. Fabrega A, Vila J. *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* Skills To Succeed in the Host: Virulence and Regulation". *Clin Micro Rev.* 2013; 26 (2): 308–41.
53. Winfield M, Groisman E. Role of Nonhost Environments in the Lifestyles of Salmonella and *Escherichia coli.* *App Env Micro.* 2003; 69 (7): 3687–94.
54. Clark MA, Barret EL. The *phs* gene and hydrogen sulfide production by *Salmonella typhimurium.* *Jou of Bact.* 1987 Jun; 169 (6): 2391–7.
55. Alvarez J, Sota M, Vivanco AB, Perales I, Cisterna R, Rementeria A i sur. Development of a Multiplex PCR Technique for Detection and Epidemiological Typing of Salmonella in Human Clinical Samples. *Jou of Clin Micro.* 2004 Apr 1; 42 (4): 1734–8.
56. Hoorfar J, Ahrens P. Automated 5' Nuclease PCR Assay for Identification of *Salmonella enterica.* *Jou of Clin Microbiol American Society for Microbiology.* 2000 Sep; 38 (9): 3429–35.
57. Brands Heymann DA, Alcamo IE, Heymann DL. *Salmonella.* Philadelphia: Chelsea House Publishers. 2006.
58. Sorrells KM, Speck ML, Warren JA. Pathogenicity of *Salmonella gallinarum* After Metabolic Injury by Freezing. *App Env Micro.* 1970 Jan; 19 (1): 39–43.
59. Beuchat LR, Heaton EK. *Salmonella* Survival on Pecans as Influenced by Processing and Storage Conditions. *App Env Micro.* 1975 Jun; 29 (6): 795–801.
60. Goodfellow SJ, Brown WL. Fate of *Salmonella* Inoculated into Beef for Cooking. *Jou Food Prot.* 1978 Aug; 41 (8): 598–605.
61. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (ex Kauffmann and Edwards) Le Minor and Popoff serovar *Enteritidis* (ATCC® 13076™) [Internet]. American Type Culture Collection; [citirano 2017 Jul 20]. Dostupno na: <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/13076.aspx>.
62. Katalinic V, Milos M, Modun D, Music I, Boban M. Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin. *Food Chem.* 2004; 86:593–600.
63. Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996; 23:70–6.
64. Theuretzbacher U. Antibiotic innovation for future public health needs. *Clin Microbiol Infect.* 2017 Jun 23. pii: S1198-743X (17)30344-0.
65. Zhou M, Hong Y, Lin X, Shen L, Feng Y. Recent pharmaceutical evidence on the compatibility rationality of traditional Chinese medicine. *J Ethnopharmacol.* 2017 Jul 12; 206:363-375
66. Daglia M, Papetti A, Grisoli P, Aceti C, Dacarro C, Gazzani G. Antibacterial activity of red and white wine against oral streptococci. *J Agric Food Chem.* 2007; 55:5038–42.
67. Pinelo M, Manzocco L, Nunez MJ, Nicoli MC. Solvent effect on quercetin antioxidant capacity. *Food Chem.* 2004; 88:201–7.
68. Moretro T, Daeschel MA. Wine is bactericidal to foodborne pathogens. *J Food Sci.* 2004; 69:251–7.
69. Carneiro A, Couto JA, Mena C, Queiroz J, Hogg T. 2008. Activity of wine against *Campylobacter jejuni.* *Food Control.* 2008; 19:800–5.
70. Serafini M, Maiani G, Ferro-Luzzi A. Effect of ethanol on red wine tannin - protein (BSA) interactions. *J Agric Food Chem.* 1997; 45:3148–51.
71. Zanchi D, Vernhet A, Poncet-Legrand C, Cartalade D, Tribet C, Schweins R, Cabane B. Colloidal dispersions of tannins in water-ethanol solutions. *Langmuir.* 2007; 23:9949–59.

72. Zanchi D, Poulain C, Konarev P, Tribet C, Svergun DI. Colloidal stability of tannins: astringency, wine tasting and beyond. *J Physics: Condens Matter*. 2008; 20:494224.
73. Lai NM, Lai NA, O'Riordan E, Chaiyakunapruk N, Taylor JE, Tan K. Skin antiseptics for reducing central venous catheter-related infections. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016 Jul 13;7:CD010140.
74. Radovanovic A, Radovanovic B, Jovancicevic B. Free radical scavenging and antibacterial activities of southern Serbian red wines. *Food Chem*. 2009; 117:326–31.
75. Mudnic I, Modun D, Rastija V, Vukovic J, Brizic I, Katalinic V, et al. Antioxidative and vasodilatory effects of phenolic acids in wine. *Food Chemistry*. 2010; 119: 1205-1210.
76. Baghaturia NS. Georgian winemaking. Theory and Practice. Tbilisi 2010. ISBN 978-9941-0-2534-1.
77. Ferreira S, Silva F, Queiroz JA, Oleastro M, Domnigues FC. Resveratrol against *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus*: activity and effect on cellular function. *Biotechnol Lett*. 2015 Jan; 37 (1):9-18.
78. Ferreira C, Soares DC, Nascimento MT, Pinto-da-Silva LH, Sarzedes CG, Tinoco LW et al. Resveratrol is active against *Leishmania amazonensis*: in vitro effect of its association with Amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Oct; 58 (19):6197-208.
79. Kato A, Naiki-Ito A, Nakazawa T, Hayashi K, Naitoh I, Miyabe K et al. Chemopreventative effect of resveratrol and apocynin on pancreatic carcinogenesis via modulation of nuclear phosphorylated GSK3 $\beta$  and ERK1/2. *Oncotarget*. 2015 Dec 15; 6 (49):42963-75.
80. Rege SD, Geetha T, Griffin GD, Broderick TL, Babu JR. Neuroprotective effects of resveratrol in Alzheimer disease pathology. *Front Aging Neurosci*. 2014 Sep 11;6:218.
81. Carrizzo A, Forte M, Damato A, Trimarco V, Salzano F, Bartolo M et al. Antioxidant effects of resveratrol in cardiovascular, cerebral and metabolic disease. *Food Chem Toxicol*. 2013;61:215-26.

## **8. SAŽETAK**

**Cilj:** Za razliku od standardnog bijelog vina, čiji su biološki učinci istraživani, biološki učinci, uključujući antimikrobne i antioksidacijske učinke maceriranog bijelog vina nisu do sada istraživani. Stoga su ciljevi ovog istraživanja: ispitati antimikrobni učinak maceriranog bijelog vina protiv bakterije *E. coli* i *S. enterica*, serovar *Enteritidis*; usporediti antimikrobni učinak maceriranog i standardnog bijelog vina te utvrditi utječe li tehnološki postupak produljene maceracije na antimikrobni učinak bijelog vina; utvrditi povezanost sadržaja ukupnih fenola i fenolnog sastava s antimikrobnim učincima vina.

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

**Rezultati:** Koncentracija ukupnih fenola bila je gotovo deset puta, a flavonoida više od nekoliko stotina puta manje u standardnom vinu u odnosu na uzorak maceriranog bijelog vina. Sukladno tome, macerirano bijelo vino ostvarilo je i snažniji antioksidacijski učinak. S druge strane macerirano je vino ostvarilo slabiji antibakterijski učinak protiv obje bakterijske vrste s vremenom inkubacije koje je bilo različito za svaku kombinaciju uzorka vina i bakterijske vrste.

**Zaključci:** Tehnološki postupak produljene maceracije rezultirao je vinom bogatijeg ukupnog fenolnog, flavonoidnog i ne-flavonoidnog sadržaja te snažnijeg antioksidacijskog djelovanja. Macerirano bijelo vino proizvedeno tehnološkim postupkom produljene maceracije ostvarilo je antibakterijski učinak protiv *E. coli* i *S. enterica*, serovar *Enteritidis*. Antimikrobni učinak maceriranog vina bio je slabiji u odnosu na učinak standardnog vina.

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

## **9. SUMMARY**



**The research goal:** Unlike standard white wine, which biological effects have been investigated, biological effects, including antimicrobial and antioxidant effects of macerated white wine, have not been studied so far. Therefore, the aims of this study were to examine the antimicrobial effect of macerated white wine against *E. coli* and *S. enterica*, serovar *Enteritidis*; compare the antimicrobial effect of macerated and standard white wines and determine whether the technological process of prolonged maceration affects the antimicrobial activity of white wine; to establish the correlation between total phenol and phenolic content with the antimicrobial effects of wine

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

**Results:** Concentration of total phenol was almost ten times, and flavonoids over several hundred times less in the standard wine sample in comparison to the macerated one. Accordingly, macerated wine has a stronger antioxidant effect. On the other hand, the macerated wine had a lower antibacterial effect against both bacterial species with incubation time that was different for each combination of wine and bacterial species.

**Conclusions:** The technological process of extended maceration resulted in a wine of richer total phenol, flavonoid and non-flavonoid content and stronger antioxidant activity. The macerated white wine produced by the technological process of prolonged maceration showed antibacterial effect against *E. coli* and *S. enterica*, serovar *Enteritidis*. The antimicrobial effect of macerated wine was weaker than the effect of standard wine.

**This work was supported by Croatian Science Foundation (HRZZ), project 8652 „Biological Effects of Wine: The Influence of Vinification Technology, Dealcoholization and Aging of Wine“, project leader prof. Mladen Boban.**

## **10. ŽIVOTOPIS**

Rođen sam 1. travnja 1994. u Zadru. Osnovnu školu Privlaka završio sam 2008. godine u Privlaci pokraj Zadra. Maturirao sam s odličnim uspjehom u Klasičnoj gimnaziji Ivana Pavla II. u Zadru. Od 2012. godine pohađam studij farmacije na Kemijsko-tehnološkom i Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu, gdje također postižem odlične rezultate. Dobitnik sam dvije dekanove i dvije rektorove nagrade. Bio sam član studentskog zbora na Kemijsko-tehnološkom fakultetu u Splitu i izvršnog odbora splitskog ogranka Udruge studenata farmacije i medicinske biokemije Hrvatske, za vrijeme čijeg mandata je udruga dobila priznanje Internacionalne federacije studenata farmacije za najbolju udrugu među svim članicama. Stručno osposobljavanje odradio sam u Ljekarnama Splitsko-dalmatinske Županije u ljekarničkoj jedinici Sućidar-Pujanke. Tečno govorim i pišem engleski (razina B2 ili iznad u svim područjima) te se služim osnovnom razinom talijanskog jezika (razina A2).