

# Fenolni profil i biološki potencijal nusproizvoda vinifikacije bijelog vina

---

**Tadić, Andrea**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2022**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:597338>

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

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

*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**FENOLNI PROFIL I BIOLOŠKI POTENCIJAL**  
**NUSPROIZVODA VINIFIKACIJE BIJELOG VINA**

**ZAVRŠNI RAD**

**ANDREA TADIĆ**

**Matični broj: 94**

**Split, srpanj, 2022.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA**

**FENOLNI PROFIL I BIOLOŠKI POTENCIJAL**  
**NUSPROIZVODA VINIFIKACIJE BIJELOG VINA**

**ZAVRŠNI RAD**

**ANDREA TADIĆ**

**Matični broj: 94**

**Split, srpanj, 2022.**

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

**PHENOLIC PROFILE AND BIOLOGICAL POTENTIAL  
OF WHITE WINE VINIFICATION BY-PRODUCTS**

**BACHELOR TESIS**

**ANDREA TADIĆ**

**Parent number: 94**

**Split, july, 2022.**

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 25. izvanrednoj sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta održanoj 25. ožujka 2022 godine.

**Mentor:** Doc. dr. sc. Danijela Skroza

**Pomoć pri izradi:** Mag. ing. agr. Martina Čagalj, doktorand

### FENOLNI PROFIL I BIOLOŠKI POTENCIJAL NUSPROIZVODA VINIFIKACIJE BIJELOG VINA

Andrea Tadić, 94

**Sažetak:** Prerodom grožđa i postupkom vinifikacije zaostaju vrijedni nusproizvodi sa visokim sadržajem fenola koji posjeduju brojna pozitivna biološka svojstva, osobito antioksidacijsku i antimikrobnu aktivnost. Nusproizvod kao što je vinski talog pokazao se bogatim izvorom vlakana i fenola što omogućava njegovo korištenje u prehrani. U ovom radu su ispitana dva uzorka taloga prikupljena tijekom proizvodnje bijelog vina, nakon maceracije i prije fermentacije te nakon provedene hladne fermentacije. Određeni su ukupni fenoli metodom po Folin-Ciocalteu, fenolni profil HPLC (eng. *High performance liquid chromatography*) metodom te je ispitana antioksidacijska aktivnost FRAP (eng. *Ferric reducing antioxidant power*), ORAC (eng. *Oxygen radical absorbance capacity*) i DPPH (eng. *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical scavenging*) metodom. Rezultati ispitivanja pokazuju izuzetno visok udio fenola te raznolik fenolni profil ekstrakata. Osim fenolnog sastava uzorci su pokazali i dobru antioksidacijsku aktivnost. Iako su oba uzorka imala iznenađujuće dobre rezultate, posebno se ističe talog bijelog vina nakon maceracije obzirom da je imao gotovo dvostruko veći udio fenola kao i dvostruko bolju antioksidacijsku aktivnost u odnosu na talog vina uzorkovan nakon provedene fermentacije.

**Ključne riječi:** vinski talog, nusproizvodi, fenoli, HPLC, antioksidacijska aktivnost

**Rad sadrži:** 28 stranica, 13 slika, 5 tablica, 36 literaturna izvora

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav povjerenstva za obranu:**

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

**Datum obrane:** 15. srpnja 2022.

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

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

**Scientific area:** Biotechnical science

**Scientific field:** Food technology

**Thesis subject** was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, extraordinary session no. 25. held 25.03.2022.

**Mentor:** Ph. D. Danijela Skroza

**Technical assistance:** PhD. Student, Martina Čagalj, MSc in Marine Fishery

## **PHENOLIC PROFILE AND BIOLOGICAL POTENTIAL OF VINIFICATION BYPRODUCTS**

Andrea Tadić, 94

**Abstract:** After the grape processing and vinification, valuable by-products with a high phenolic content and numerous positive biological properties, especially antioxidant and antimicrobial activity remain. A by-product such as wine lees is a rich source of fibers and phenolics, which enables its use in nutrition. In this paper, two lees samples were collected during the production of white wine, one after maceration and before fermentation and other after cold fermentation. Total phenols were determined using the Folin-Ciocalte method, the phenolic profile by HPLC (High Performance Liquid Chromatography) method, and the antioxidant activity by FRAP (Ferric reducing antioxidant power) ORAC (Oxygen radical absorbance capacity) and DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical scavenging) method. The obtained results show an extremely high proportion of phenolics and diverse phenolic profile of the extracts. In addition to the phenolic composition, samples also showed good antioxidant activity. Although both samples had surprisingly good results, the lees after maceration stand out especially since it had almost twice higher amount of phenolics as well as two-fold higher antioxidant activity compared to the lees of white wine.

**Keywords:** wine lees, by-products, phenols, HPLC, antioxidant activity

**Thesis contains:** 28 pages, 13 figures, 5 tables, 36 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

1. PhD, Ivana Generalić Mekinić, associate professor - chair person
2. PhD, Miće Jakić, assistant professor - member
3. PhD, Danijela Skroza, assistant professor – member - supervisor

**Defence date:** 15<sup>th</sup> July 2022

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

Završni rad je izrađen u Zavodu za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju, Kemijsko tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Danijele Skroza i neposrednim vodstvom doktorandice Martine Čagalj,-u razdoblju od svibnja do srpnja 2022. godine.

Izradu rada pomogle su dr. sc. Maja Veršić Bratinčević i dr. sc. Marijana Popović sa Instituta za jadranske kulture i melioraciju krša određivanjem fenolnog profila testiranih uzoraka.



## **ZAHVALA**

*Veliko hvala mojoj mentorici doc. dr. sc. Danijeli Skroza na danim savjetima, strpljenju te idejama i utrošenom vremenu koje je pružila prilikom izrade ovog rada. Zahvaljujem se i doktorandici Martini Čagalj čija je pomoć bila od velike važnosti prilikom provedbe eksperimentalnog dijela rada. Također hvala i povjerenstvu na izdvojenom vremenu za pregled rada.*

*Želim se zahvaliti i svojoj obitelji i prijateljima koji su me kroz cijelo studiranje motivirali i pružali mi podršku.*

**HVALA!**

## **ZADATAK ZAVRŠNOG RADA:**

Zadatak završnog rada bio je pripraviti ekstrakte od nusproizvoda vinifikacije bijelog vina te im odrediti sadržaj fenola Folin-Ciocalteu metodom, fenolni profil HPLC metodom i antioksidacijsku aktivnost korištenjem FRAP (eng. *Ferric reducing antioxidant power*), ORAC (eng. *Oxygen radical absorbance capacity*) i DPPH (eng. *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical scavenging*) metode. Nakon analize dobivenih rezultata donijeti su zaključci o sadržaju fenola i antioksidacijskom potencijalu uzoraka te mogućnostima iskorištenja nusproizvoda zaostalih tijekom vinifikacije bijelog vina.

## SAŽETAK

Preradom grožđa i postupkom vinifikacije zaostaju vrijedni nusproizvodi sa visokim sadržajem fenola koji posjeduju brojna pozitivna biološka svojstva, osobito antioksidacijsku i antimikrobnu aktivnost. Nusproizvod kao što je vinski talog pokazao se bogatim izvorom vlakana i fenola što omogućava njegovo korištenje u prehrani. U ovom radu su ispitana dva uzorka taloga prikupljena tijekom proizvodnje bijelog vina, nakon maceracije i prije fermentacije te nakon provedene hladne fermentacije. Određeni su ukupni fenoli metodom po Folin-Ciocalteu, fenolni profil HPLC (eng. *High performance liquid chromatography*) metodom te je ispitana antioksidacijska aktivnost FRAP (eng. *Ferric reducing antioxidant power*), ORAC (eng. *Oxygen radical absorbance capacity*) i DPPH (eng. *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical scavenging*) metodom. Rezultati ispitivanja pokazuju izuzetno visok udio fenola te raznolik fenolni profil ekstrakata. Osim fenolnog sastava uzorci su pokazali i dobru antioksidacijsku aktivnost. Iako su oba uzorka imala iznenađujuće dobre rezultate, posebno se ističe talog bijelog vina nakon maceracije obzirom da je imao gotovo dvostruko veći udio fenola kao i dvostruko bolju antioksidacijsku aktivnost u odnosu na talog vina uzorkovan nakon provedene fermentacije.

**Ključne riječi:** vinski talog, nusproizvodi, fenoli, HPLC, antioksidacijska aktivnost

## **SUMMARY**

After the grape processing and vinification, valuable by-products with a high phenolic content and numerous positive biological properties, especially antioxidant and antimicrobial activity remain. A by-product such as wine lees is a rich source of fibers and phenolics, which enables its use in nutrition. In this paper, two lees samples were collected during the production of white wine, one after maceration and before fermentation and other after cold fermentation. Total phenols were determined using the Folin-Ciocalteu method, the phenolic profile by HPLC (High Performance Liquid Chromatography) method, and the antioxidant activity by FRAP (Ferric reducing antioxidant power) ORAC (Oxygen radical absorbance capacity) and DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical scavenging) method. The obtained results show an extremely high proportion of phenolics and diverse phenolic profile of the extracts. In addition to the phenolic composition, samples also showed good antioxidant activity. Although both samples had surprisingly good results, the lees after maceration stand out especially since it had almost twice higher amount of phenolics as well as two-fold higher antioxidant activity compared to the lees of white wine.

**Keywords:** wine lees, by-products, phenols, HPLC, antioxidant activity

## SADRŽAJ

<b>UVOD</b> .....	1
<b>1.OPĆI DIO</b> .....	2
1.1.Bijelo vino.....	2
1.1.1. Tehnologija proizvodnje bijelog vina.....	3
1.2. Kemijski i nutritivni sastav vina .....	4
1.2.1 Fenolni profil vina .....	5
<b>2.EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	9
2.1. Reagensi i uređaji.....	9
2.2. Materijal .....	9
2.3. Određivanje udjela ukupnih fenola .....	11
2.4. Određivanje fenolnog profila HPLC metodom.....	12
2.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti .....	13
2.5.1. FRAP metoda .....	13
2.5.2 DPPH metoda .....	13
2.5.3 ORAC metoda .....	14
<b>3. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	17
3.1 Fenolni sastav ekstrakata.....	17
3.2 Antioksidacijska aktivnost ekstrakata .....	20
<b>4. ZAKLJUČCI</b> .....	24
<b>5. LITERATURA</b> .....	25

## UVOD

Vino je prehrambeni proizvod dobiven potpunim ili djelomičnim vrenjem zgnječenog grožđa (masulja) ili grožđanog soka (mošta). Za proizvodnju vina koristi se svježe grožđe te ono pogodno za preradu u vino. Bijelo vino je „lakše“ i kiselije u odnosu na crno zbog manjeg udjela tanina i većeg sadržaja organskih kiselina a za njegov okus karakteristične su voćne note poput banane, jabuke, breskve ili citrusa.

Bobe grožđa su vrijedan izvor različitih fenolnih spojeva koji nisu samo odgovorni za boju grožđa i vina već imaju i pozitivan učinak na ljudsko zdravlje (zaštita srčanog i živčanog sustava, usporavanje starenja, poboljšanje zdravlja kože, sprječavanje nastanka akni, poticanje mršavljenja, poboljšanje funkcije pluća). Osim fenola, na ljudsko zdravlje povoljno djeluje i alkohol u vinu osobito na probavni sustav ali ubrzava i lučenje enzima, pospješuje prokrvljenost te smanjuje rizik od pojave krvnih ugrušaka.

U literaturi se može pronaći podatak da tijekom proizvodnje vina čak do 40% sirovine nakon završenog procesa zaostaje kao nusproizvod. Ti nusproizvodi uključuju kominu, talog, sjemenke, kožicu, peteljkovinu i lišće loze. Nastali nusproizvodi zbog bogatog kemijskog sastava i potencijalnih bioloških učinaka (antioksidacijskih i antimikrobnih aktivnosti) predstavljaju zanimljiv izvor nutritivno vrijednih spojeva koji omogućuju njihovu daljnju upotrebu u prehrambenoj industriji.

U tu svrhu u ovom radu je određen udio pojedinih fenolnih spojeva i biološki potencijal vinskog taloga (tzv. „feca“) koji zaostaje kao nusproizvod nakon vinifikacije grožđa sorte *Malvasija dubrovačka* te opravdanost njegovog daljnjeg korištenja u prehrambenoj industriji

# 1.OPĆI DIO

## 1.1.Bijelo vino

Najjednostavnija podjela, temeljena na boji, dijeli vina na bijela, crvena (crna) te ružičasta (*rosé*). Bijela vina su u pravilu kiselija, aromatičnija te ih odlikuju različite slatke note. Okus bijelog vina odlikuju kemijski sastojci kao što su etanol, kiseline i šećeri. Ono što također čini bijelo vino drugačijim od crnog je udio ukupnih fenola. [1]

Najpopularnija bijela vina u Hrvatskoj su *Graševina*, *Chardonnay* te *Bijeli pinot*. [2]

U ovom radu korištena je sorta *Malvasia dubrovačka* koja potječe iz porodice malvasija i smatra se hrvatskom autohtonom sortom a od grožđa ove sorte dobiva se snažno bijelo vino, zlatnožute boje te voćnih aroma (npr. breskva). [3]



**Slika 1.** Bijelo vino [4]

### 1.1.1. Tehnologija proizvodnje bijelog vina

Prvi korak u proizvodnji vina je berba grožđa nakon koje slijedi transport ubranog grožđa do mjesta prerade. Najvažniji uvjet za proizvodnju kvalitetnog vina je zdravo i zrelo grožđe, stoga se berba obavlja po suhom vremenu i u dobu dana kada su temperature nešto niže (rano jutro ili noć). Budući da ubrano grožđe treba preraditi u što kraćem roku, važno je organizirati neometan prijem sirovine koji uključuje kvalitativni prijem (procjena kakvoće grožđa) i kvantitativni prijem kod kojeg je potrebno odrediti količinu zaprimljenog grožđa koju je potrebno preraditi u proizvodnom pogonu. Nakon vaganja grožđe ide na postupak muljanja/ runjenja pri čemu se dobiva masulj. Prema Pravilniku o proizvodnji vina (-NN 2/2005, Pravilnik o proizvodnji vina, članak 2.) „*masulj*“ je *zgnječeno grožđe s peteljkom ili bez nje a „mošt“ je tekući proizvod, proizveden odgovarajućim postupcima tiještenja i ocjeđivanja cijelog grožđa ili masulja, a sadrži minimalnu količinu šećera od 64 ° Oe (Oechsleovi stupnjevi).* [1,5,6,7]

Muljanje je gnječenje grožđa koje se nekad vršilo na način da se grožđe gazilo nogama dok se danas taj postupak obavlja uz pomoć motornih ili ručnih muljača. Runjenje je odvajanje peteljkovine tijekom muljanja čime se utječe na smanjenje razine tanina u moštu/vinu koji im daju gorak okus. Tijekom ili po završetku muljanja potrebno je dodati sumporov dioksid koji sprječava oksidaciju te ima antimikrobno djelovanje nakon čega se uobičajeno provjerava koncentracija šećera te se po potrebi vrši korekcija (došećeravanje). [7]

Korak u proizvodnji bijelog vina koji je proizvoljan je maceracija. Iako maceracija nije nužna, sve se više primjenjuje jer se ovim postupkom izvlače pigmenti te aromatske tvari sadržani u pokožici bobbe grožđa. Maceracijom, koja se obično provodi tijekom 24 h na temperaturama ispod 10 °C navedene tvari prelaze u mošt što na koncu utječe na poboljšanje boje i arome vina. [7]

Nakon završetka maceracije, mošt ide na otakanje a zaostali masulj ide na prešanje/tiještenje čime se dobiva mošt (groždani sok). Pretočeni mošt zajedno sa moštom dobivenim prešanjem se potom taloži kako bi se uklonili zaostali kruti dijelovi kao što je zemlja, dijelovi pokožice, peteljke, sjemenki, itd. [7]



Nakon taloženja, mošt se dekantira u posude za vrenje i dodaje mu se vinski kvasac a vrenje u pravilu započinje nakon 24 do 48 sati. Vrenje ili alkoholna fermentacija najbitniji je korak u proizvodnji vina kod kojeg uz oslobađanje topline dolazi do pretvorbe šećera u etilni alkohol i ugljikov dioksid. [7]

Glavni čimbenik fermentacije koji utječe na buduću kvalitetu vina je temperatura. Optimalna temperatura fermentacije bijelog vina je 18-20 °C, bez većih odstupanja a razlikujemo tri faze vrenja: početno, glavno (burno) te završno (tiho) vrenje. [7]

Vrenje traje do 30 dana ako se optimalna temperatura održava nepromjenjivom, a po završetku, mlado vino je potrebno pretočiti u drugi spremnik kako nepoželjne tvari u talogu ne bi utjecale na kvalitetu vina. [7]

## **1.2. Kemijski i nutritivni sastav vina**

Glavna dva sastojka vina su voda i alkohol (etanol). Međutim, okus vina ovisi o velikom broju spojeva iz različitih kemijskih skupina kao što su alkoholi, aldehidi, ketoni, esteri, amidi, karboksilne kiseline, fenoli, pirazini i mnogi drugi spojevi koji se obično identificiraju različitim kromatografskim tehnikama kao što su plinska kromatografija, tankoslojna kromatografija (TLC) te tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC). [1]

Voda, s najvećim udjelom u vinu (čak 86%) predstavlja glavni medij koji omogućava odvijanje određenih kemijskih reakcija prilikom vrenja te starenja vina ali ujedno i omogućava i topljivost različitih tvari u vinu kao što su npr. soli. [1,8]

Šećeri koji su najzastupljeniji u vinu su glukoza i fruktoza i oni uglavnom korigiraju okuse kiselosti, gorčine te trpkosti. U nekim zemljama, primjerice Njemačkoj i Austriji zbog hladnije klime šećer se slabije sintetizira u grožđu pa je dozvoljeno naknadno dodavanje industrijskog šećera prilikom prerade grožđa u vino. Veći sadržaj šećera imaju slatka vina (desertna vina). [8]

Drugi vodeći sastojak u vinu je alkohol odnosno etanol koji najviše utječe na okus, ali ima i bitnu ulogu u reguliranju kiselosti kod starenja vina. [8]

Organske kiseline koje u najvećoj koncentraciji pronalazimo u vinu su vinska, jabučna i limunska. Kiseline su odgovorne za različite voćne note, pa se tako npr. oštar i grub okus javlja se zbog prisutnosti jabučne kiseline, dok limunska kiselina ostavlja svjež i citrusni dojam. [8]

Fenolne tvari je također potrebno posebno istaknuti zbog svojih pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje. Najpoznatija podjela fenolnih tvari je na flavonoide, fenolne kiseline te stilbene. [8,9]

**Tablica 1.** Prosječni kemijski i nutritivni sastav 100 g bijelog vina [10]

Nutrijenti		Vitamini		Minerali	
Voda	86,9 g	Vitamin C	0 mg	Kalcij	9 mg
Energija	82 kcal	Tiamin	0,005 mg	Željezo	0,27 mg
Proteini	0,07 g	Riboflavin	0,015 mg	Magnezij	10 mg
Ukupne masti	0 g	Niacin	0,108 mg	Fosfor	18 mg
Ugljikohidrati	2,6 g	Vitamin B-6	0,05 mg	Kalij	71 mg
Ukupna vlakna	0 g	Vitamin B-9	1 µg	Cink	0,12 mg
Etilni alkohol	10,3g	Vitamin K	0,4 µg	Natrij	5 mg
		Kolin	4,3 mg	Selenij	0,1 µg
		Vitamin A	0 µg	Bakar	0,004 mg

### 1.2.1 Fenolni profil vina

Fenolni spojevi predstavljaju sekundarne biljne metabolite koji su građeni od aromatskog prstena supstituiranog sa jednom ili više hidroksilnih skupina. Rezultat toga je mnogobrojna i heterogena skupina spojeva koji se razlikuju po svojoj strukturi i svojstvima. Fenoli su zaslužni za boju(-pigmenti), okus (-npr. gorčina i trpkost), sigurnost hrane (antimikrobna i antioksidacijska svojstva), ali su bitni i zbog učinka na ljudsko zdravlje. [11]

Prema strukturi možemo ih podijeliti na jednostavne fenole te složenije strukture kao što su lignani, flavonoidi, tanini, stilbeni. U jednostavne fenole ubrajamo hidroksicimetnu i hidroksibenzojevu kiselinu i njihove derivate. Fenolne kiseline mogu ulaziti u metaboličke reakcije i povezivati se sa šećerima i proteinima. Lignani su derivati fenolnih kiselina, najzastupljeniji su u lanenim sjemenkama, sezamu te voću i povrću. Flavonoidi se dijele na flavonole, flavanole i isoflavone. Flavonoidi se osobito ističu po žutoj boji. [12]

Fenolni spojevi u bijelom vinu su flavonoidi kao što su flavanoli, flavonoli, flavan-3-oli, dok su neflavonoidi uglavnom fenolne kiseline. [13]

**Tablica 2.** Koncentracija fenolnih kiselina i flavonoida u bijelom vinu [13]

Fenolni spojevi	Koncentracija(mg/L)
<b>NEFLAVONOIDI</b>	160-260
Hidroksibenzojeva kiselina	0-100
Hidroksicinamatna kiselina	130-154
Resveratrol	0,04
<b>FLAVONOIDI</b>	25
Flavonoli	U tragovima
Katehin	15,4
Epikatehin	8,7

Fenolne spojeve možemo pronaći i u nusproizvodima vinifikacije kao što su komina, pokožica, sjemenke, peteljke te talog. Ovi nusproizvodi smatraju se vrijednim izvorom bioaktivnih komponenti sa antioksidacijskom aktivnošću te kao takvi mogu biti korišteni u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Određene vrste nusproizvoda donekle su istražene i poznata je njihova biološka aktivnost dok je vinski talog između navedenih najslabije istražen nusproizvod. [14,15]

**Tablica 3.** Fenolni profil nusproizvoda vinifikacije [16]

Nusproizvod	Fenoli
Komina	Fenolne kiseline, antocijani, katehin
Sjemenke	Katehin, galna kiselina, tanini
Pokožica	Flavan-3-oli, hidroksibenzojeva i hidroksicinamatna kiselina, stilbeni
Lišće/Peteljke	Flavonoli, tanini, hidroksibenzojeva i hidroksicinamatna kiselina, stilbeni

### 1.3. Biološki potencijal nusproizvoda vinifikacije

U posljednje vrijeme jedan od prioriteta prehrambene industrije je iskoristiti sporedne produkte iz lanaca proizvodnje hrane, jer upravo oni za proizvođače predstavljaju velike gubitke te problem s ekonomskog i ekološkog stajališta. Uz to, velik broj provedenih znanstvenih studija ukazuju na njihovu vrijednost, iskoristivost i mogućnost daljnje primjene. [17]

Među brojnim fitokemikalijama najviše se ističu fenolni spojevi koji pokazuju antioksidativna, protuupalna i antimikrobna svojstva te se mogu dalje koristiti u kreiranju, razvoju i proizvodnji novih prehrambenih proizvoda s dodanom vrijednošću. [17]

Grožđe i proizvodi od grožđa obiluju fenolnim spojevima koji pokazuju pozitivne učinke na ljudsko zdravlje. [18,19]

Fenolne komponente iz grožđa procesom vinifikacije prelaze u vino ali njihov veliki udio zaostaje u nusproizvodima. Vinski talog je ostatak koji se formira na dnu spremnika nakon fermentacije i koji zaostaje nakon pretakanja vina. Fenolni profil taloga ovisi o sorti grožđa te o uvjetima vinifikacije. Neka istraživanja pokazuju da je vinski talog moguće koristiti i kao dodatak u hrani s ciljem poboljšanja nutritivne vrijednosti namirnica. Talog sadrži bjelančevine, netopive ugljikohidrate te lignine (-netopiva vlakna). Potencijal vinskog taloga je istražen u studiji gdje se primijenio kao konzervans u mesnim proizvodima a rezultati su dokazali njegova antimikrobna svojstva prema aerobnim bakterijama te pozitivan utjecaj na organoleptička svojstva mesa. [15,20,21,22]

Tijekom prerade grožđa najveći udio fenolnih spojeva zaostaje u komini koja predstavlja 20-25% ukupne mase grožđa u proizvodnji vina. Sastoji se od kožice, pulpe te ostataka peteljkovine i sjemenki a tradicionalno se koristi za proizvodnju gnojiva, hrane za životinje te brojnih vrsta destilata. Zbog svog bogatog kemijskog sastava (vlakna, fenoli, pigmenti te minerali) posljednjih godina komina grožđa se sve više istražuje. Glavni predstavnici fenolnih spojeva u komini su fenolne kiseline, antocijani, katehin te flavonolni glikozidi. Katehin je pripadnik flavonoida, antioksidans koji ima antikancerogeno djelovanje te pruža zaštitu organizma inhibirajući nastanak slobodnih radikala. [21,23,24,25]

Sjemenke grožđa sadrže bioaktivne spojeve kao što je resveratrol te linolnu kiselinu. Također sadrže i vitamin E., te značajne količine linolne kiseline kojoj je dokazan pozitivan učinak kod kardiovaskularnih bolesti, u prevenciji raka i hipertenzije te kod autoimunih poremećaja. [14,26]

Kožica i pulpa bogat su izvor vlakana i fenolnih spojeva koji uključuju galnu, vanilinsku te kaftarinsku kiselinu i flavonole kao što je kvercetin. Kvercetin je jak antioksidans koji ima dokazano antikancerogeno, protuupalno, antialergijsko djelovanje. Njihova prisutnost u kožici i pulpi najviše ovisi o samom postupku vinifikacije te sorti grožđa. [21,27]

Lišće loze je bogato flavonolima, antocijanima te taninima, vitaminima C i E, mineralima i šećerima te se stoga u nekim mediteranskim zemljama koriste za ljudsku prehranu ili kao dodatak. Lišće pokazuje i antimikrobna svojstva. [28]

## **2.EKSPERIMENTALNI DIO**

### **2.1. Reagensi i uređaji**

#### **Reagensi**

Svi korišteni reagensi su odgovarajuće analitičke čistoće a proizvođači su Fluka (Švicarska), Kemika (Hrvatska), Mercka (Njemačka), Gram-Mol (Hrvatska) te Sigma-Aldrich GmbH (Njemačka).

#### **Uređaji**

Mlinac za kavu, Joy Delimano, Hrvatska

Uređaj za ultrazvučnu ekstrakciju, Ultrasonic cleaner, UK

Analitička vaga, Kern, Model ALS 120-4, Kingston, UK

Spektrofotometar: SPECORD 200 Plus, Edition 2010; Analytik Jena AG, Jena, Njemačka

Tecan MicroPlates Reader, model Sunrise, Tecan Group Ltd, Mannedorf, Švicarska

Tecan BioTek, model: Synergy HTX, Inc., Winooski, VT

Mikrotitarske pločice, nesterilne, Sarsted, Njemačka

HPLC-DAD Ultimate 3000 (Termo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)

### **2.2. Materijal**

U eksperimentalnom dijelu korištena su dva uzorka taloga uzorkovanog tijekom procesa vinifikacije bijelog grožđa sorte *Malvasija dubrovačka*. Uzorak broj 1. predstavlja talog nastao tijekom maceracije masulja u trajanju od 24 sata prije početka fermentacije, dok uzorak 2. predstavlja talog uzorkovan nakon provedene hladne fermentacije u trajanju od 20 dana. Vinifikacija je provedena u podrumu Srednje škole „Braća Radić“ u Kaštel Štafiliću 2021. godine. Nakon uzorkovanja, talozi su pohranjeni u zamrzivač na -20°C do ekstrakcije prije koje su isti osušeni pri 60 °C u sušioniku do konstantne mase a potom homogenizirani korištenjem električnog mlinca.



**Slika 2.** Osušeni i homogenizirani uzorci

Usitnjeni uzorak taloga korišten je za pripravu ekstrakta na način da je vagano po 2 g pojedinog uzorka u Falcon epruvete nakon čega je dodano 10 mL 50%-tnog etanola. Ekstrakcija je provedena u ultrazvučnoj kupelji pri 60 °C i 40 kHz u trajanju od 1 sata.



**Slika 3.** Ultrazvučna kupelj

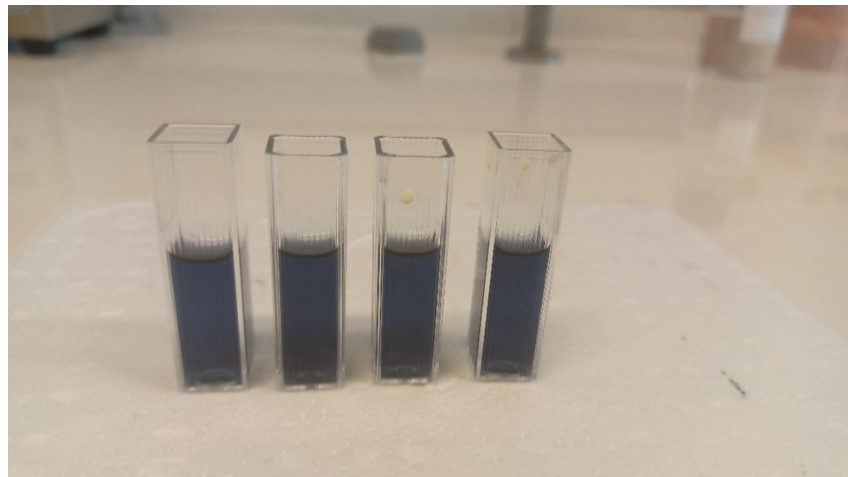
Nakon ekstrakcije uzorci su filtrirani preko naboranog filter papira i skladišteni u hladnjaku na +4°C. Prilikom analize uzorci su razrijeđeni u omjeru 1:10.

### 2.3. Određivanje udjela ukupnih fenola

Udio ukupnih fenola u uzorcima određen je metodom po Folin-Ciocalteu kojom se mjeri ukupna koncentracija fenolnih spojeva koji s Folin-Ciocalteu reagensom tvore plavi kompleks dok je nereducirani Folin- Ciocalteu reagens žute boje. Intenzitet nastalog obojenja mjeri se u odnosu na slijepu probu pri valnoj duljini od 765 nm. [29]

#### ***Postupak:***

U kivete se odpipetira 25  $\mu\text{L}$  uzorka te doda 1,5 mL destilirane vode i 125  $\mu\text{L}$  Folin-Ciocalteu reagensa. Otopina se dobro promiješa te se nakon 1 minute doda 375  $\mu\text{L}$  20%-tne otopine natrijeva karbonata i 475  $\mu\text{L}$  destilirane vode. Pripremljene otopine se odlože u tamu i nakon 2 h im se očita apsorbancija na valnoj duljini od 765 nm. Rezultati se izražavaju u mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) jer je standardizacija izvršena galnom kiselinom. Analize su urađene u 4 ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD).



**Slika 4.** Uzorci otopina kod određivanja fenola u uzorcima Folin-Ciocalteu metodom nakon 2 sata



## 2.4. Određivanje fenolnog profila HPLC metodom

Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (HPLC) je separacijska tehnika kojom se analiziraju različiti prirodni spojevi. Kod HPLC metode korištenjem visokih tlakova otapalo predstavlja mobilnu fazu prolazi zatvorenom kolonom koja je ispunjena finim punjenjem i nosi uzorak. U odnosu na ostale kromatografske metode, prednosti HPLC-a su relativno visok radni tlak, mali promjer kolone, mali promjer čestica punila, visok stupanj razdvajanja te brza analiza. [30]

### *Postupak:*

Za određivanje fenolnog profila koristio se HPLC-UV/VIS Nexera LC-40 (Shimadzu, Kyoto, Japan) i odgovarajući program za obradu podataka. Kromatografska kolona korištena u radu je Phenomenex C18 (250 × 4,6 mm i veličine čestica 5 μm (Phenomenex, California, USA). Korištene su dvije mobilne faze: faza A (voda/fosfatna kiselina, 98:2, v/v), faza B (Acetonitril) pri protoku od 1,0 mL/min prema gradijentu protoka otapala prikazanom u tablici 4. Temperatura kolone je 30 °C, volumen injektiranog uzorka 10 μL a detekcija je vršena pri valnim duljinama od 220 i 320 nm.

**Tablica 4.** Gradijent protoka otapala

t, min	Otapalo A, %	Otapalo B, %
0	96	4
16	85	15
19	85	15
37,5	85	15
39	60	40
49	60	40
50	96	4
52	96	4

Identifikacija pojedinih spojeva je rađena pomoću UV-VIS spektra i retencijskog vremena spoja koristeći usporedbu sa standardima. Analiza je provedena u dva ponavljanja, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD u mg/L.

## 2.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

### 2.5.1. FRAP metoda

FRAP metodom mjeri se antioksidacijski potencijal uzoraka, a mehanizam reakcije se očituje kroz redukciju kompleksa Fe<sup>III</sup>-TPTZ (željezo 2,4,6-tripiridil-s-triazin) koji je žute boje u Fe<sup>II</sup> oblik koji je plav što ovisi o koncentraciji dodanog antioksidansa. Reakcija se odvija pri pH 3,6 a mjerenje apsorbancije se provodi na 592 nm. [29]

#### *Postupak:*

U otvore mikrotitarske pločice otpipetira se 300 µL svježe pripravljene otopine FRAP reagensa (smjesa otopine TPTZ (2,4,6- tripiridil-s-triazin), FeCl<sub>3</sub> (20 mmol/L) i acetatnog pufera (300 mmol/L, pH=3,6) u omjeru 2,5:2,5:25). Apsorbancija se očitava odmah te se nakon toga doda 10 µL uzorka te se prati promjena apsorbancije nakon četiri minute. Promjena apsorbancije je izračunata kao razlika između konačne apsorbancije nakon određenog vremena te apsorbancije FRAP reagensa prije dodavanja uzorka i ista se uspoređuje s vrijednostima dobivenim za otopinu standarda, u ovom slučaju je to otopina Trolox-a. Mjerenja su provedena u 4 ponavljanja i rezultati su izraženi kao µM Trolox ekvivalenti (TE).

### 2.5.2 DPPH metoda

Ovom metodom mjeri se sposobnost antioksidansa da reagira s DPPH (2,2-difenil-pikrilhidrazil) radikalom. Otopina DPPH<sup>•</sup> radikala je ljubičasta, a on predstavlja jedan od rijetkih komercijalnih, stabilnih, organskih, dušikovih radikala. Sposobnosti *hvatanja* molekula slobodnih radikala se računa kao postotak inhibicije radikala, a mjerenja kod ove metode se provode pri valnoj duljini od 517 nm. [29]

#### *Postupak:*

U otvore mikrotitarske pločice se doda 290 µL otopine DPPH i očitava mu se apsorbancija pri 517 nm. Potom se u otvore doda 10 µL uzorka te se nakon jednog sata ponovo izmjeri apsorbancija uzorka. Mjerenja su provedena u 4 ponavljanja, rezultati su prikazani kao % inhibicije DPPH radikala.

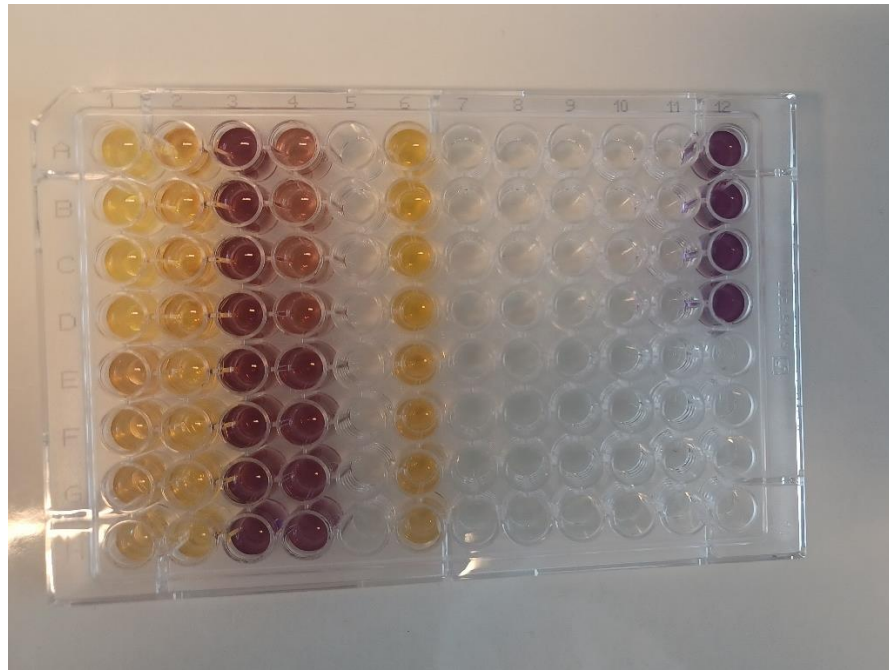
Postotak inhibicije DPPH radikala računa se prema izrazu:

$$\text{Inhibicija (\%)} = [ (AC(0) - AA(t) / AC(0) ] \times 100;$$

pri čemu

AC(0) predstavlja apsorbanciju DPPH radikala pri  $t=0$

AA(t) predstavlja apsorbanciju nakon vremena  $t$ .



**Slika 5.** Izgled mikrotitarske pločice kod DPPH metode

### 2.5.3 ORAC metoda

ORAC metoda temelji se na mjerenju fluorescencije čime se određuje antioksidacijski kapacitet uzorka u vidu njegove sposobnosti inhibiranja slobodnog peroksil radikala koji nastaje raspadanjem azo spojeva kao npr. AAPH (2,2 azobis metilpropionamid dihidroklorid). Kod ove metode mjeri se slabljenje fluorescencije pri čemu antioksidansi usporavaju reakcije prijenosom atoma vodika i inhibiraju razgradnju fluoresceinskog signala. Prije mjerenja potrebno je uređaj termostatirati na temperaturu od 37 °C kako bi brzina stvaranja radikala bila konstantna. Trolox otopina se koristi kao kontrola. [29]

**Postupak:**

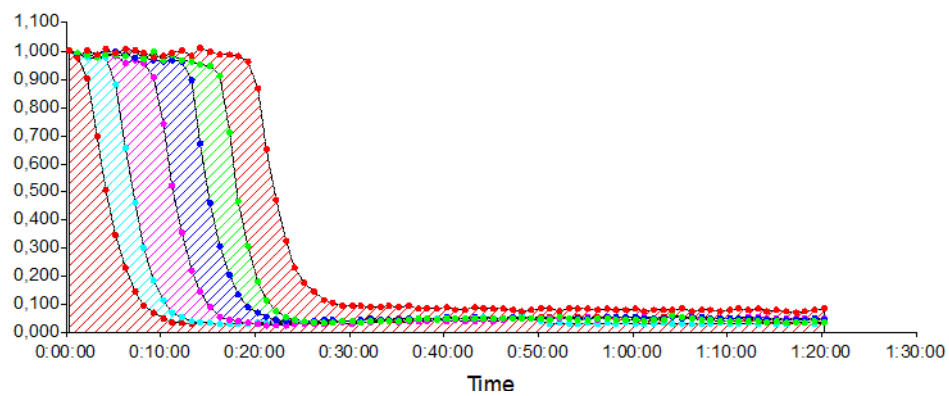
U otvore mikrotitarske pločice doda se 150  $\mu\text{L}$  fluoresceina ( $c=0,08 \mu\text{M}$ ) i 25  $\mu\text{L}$  uzorka ( $c=0,075 \text{ M}$  fosfatnog pufera za slijepu probu/otopine Troloksa za izradu baždarnog pravca). Mjerenje se provodi u spektrofotometru pri 485 nm i 520 nm. Pripremljene otopine se termostatiraju 30 min te se nakon toga dodaje 25  $\mu\text{L}$  AAPH ( $c=0,15 \text{ mol/L}$ ) i svake minute se mjeri promjena intenziteta fluorescencije tijekom 80 minuta.



**Slika 6.** Izgled crne mikrotitarske pločice za mjerenje fluorescencije kod ORAC metode



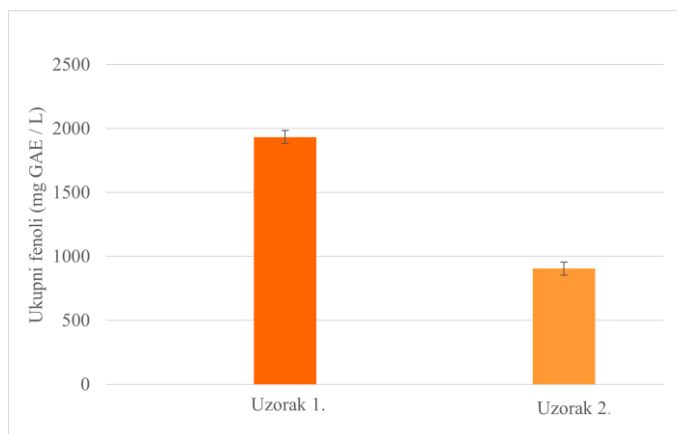
**Slika 7.** Izgled otopine fluoresceina



**Slika 8.** Primjer izgleda normaliziranih krivulja korištenih pri izradi baždarnog pravca Trolox kod ORAC metode

### 3. REZULTATI I RASPRAVA

#### 3.1 Fenolni sastav ekstrakata



**Slika 9.** Prikaz udjela ukupnih fenola u testiranim uzorcima

Udio ukupnih fenola određen je Folin-Ciocalteu metodom a rezultati su prikazani na slici 10. Iz grafičkog prikaza može se uočiti iznenađujuće visok sadržaj ukupnih fenola, osobito u uzorku 1 koji je talog odvojen nakon jednodnevne maceracije prije fermentacije gdje udio ukupnih fenola iznosi 1933,3 mg GAE/L, dok je u uzorku 2 koji je vinski talog uzorkovan nakon fermentacije u trajanju od 20 dana, udio bio dvostruko niži i iznosio je 905,56 mg GAE/L. Usporedbom rezultata ovog rada s rezultatima dostupnim iz znanstvenih istraživanja koji su analizirali udio fenola u bijelom vinu, može se zaključiti da su vrijednosti sadržaja ukupnih fenola u ekstraktima nusproizvoda bile gotovo u istom rangu kao i u vinima. Tako npr. u istraživanju koje su proveli Di Mattia i sur. (2015) na talijanskim sortama bijelog vina *Trebbiano d'Abruzzo*, ukupni fenoli su iznosili 1052 mg GAE/L. U ekstraktima vina dviju grčkih sorti (*Malagouzia* i *Assyrtiko*) udio ukupnih fenola iznosio je od 81,1-155,7 mg GAE/ mL ekstrakta. [31,32] Mitrevska i sur. (2020) ispitali su sadržaj ukupnih fenola u makedonskim sortama bijelog vina *Smederevka*, *Temjanika* i *Žilavka*, od kojih *Temjanika* pokazuje najveći udio fenola, 437,27 mg GAE/L, što je znatno manji udio u usporedbi s sadržajem ukupnih fenola koji su određeni u ekstraktima taloga ispitivanih u ovom radu. [33]

Broj znanstvenih studija s temom istraživanja udjela fenola u ekstraktima taloga je zanemariv u odnosu na istraživanja vina i/ili vinskih ekstrakata, osobito kada je riječ o bijelim vinima. Zhijing i sur. (2018) istražili su vrijednosti sadržaja ukupnih fenola dobivene za ekstrakte vinskog taloga različitih sorti bijelog vina (*Chardonnay, Sauvignon Blanc, Pinot Gris*) u rasponu od 3,1- 10,3 mg/g suhe tvari. Ono što je slično s našim istraživanjima je podatak da je sorta *Pinot Gris* tijekom vinifikacije također imala uključen korak maceracije. [34]

U ovom završnom radu analiziran je i fenolni profil uzoraka, a rezultati su prikazani u tablici 5. Kao i kod udjela ukupnih fenola uzorak 1 je imao znatno veći udio ukupnih fenolnih komponenti u odnosu na uzorak 2. U oba uzorka prevladava veći udio fenolnih kiselina u odnosu na polifenole. Najdominantniji spoj u oba uzorka je bila *p*-hidroksi benzojeva kiselina čija je u koncentracija u uzorku 1 iznosila 64,1, a u uzorku 2 29,4 mg/L. Od ostalih fenolnih kiselina po visokoj zastupljenosti u uzorku 1 se izdvajaju protokatehinska, gentisinska i galna u koncentracijama od 12-14,4 mg/L. Od flavanola dominantni su katehin (10,5 mg/L), epikatehin (20,1 mg/L) i epigalokatehin galat (12,4 mg/L). U uzorku 2 svi navedeni flavonoli su bili prisutni u znatno nižoj koncentraciji, katehina je bilo dva puta manje, epikatehina pet puta manje, a epigalokatehin galata gotovo šest puta manje. Ono što je zanimljivo da je u uzorku 1 koncentracija kvercetina iznosila 6,5 mg/L dok je u uzorku 2 bila 10,1 mg/L. I flavanon naringenin je bio dominantniji u uzorku 1 (1,1 mg/L) u odnosu na uzorak 2 (0,14 mg/L). Slično se javlja i kod kava kiseline gdje je udio bio dvostruko veći u uzorku 2. Iako u niskoj koncentraciji, prisustvo stilbena resveratrola je potvrđeno u oba uzorka.

Pregledom znanstvenih istraživanja uočeno je da testirani uzorci imaju višu koncentraciju pojedinih fenolnih spojeva u odnosu na rezultate drugih istraživanja. Jara-Palacios i sur. (2019) su u uzorcima ekstrakta taloga crnog vina *Pinot noir* izdvojili kao dominantne fenole katehin (4 µg/g suhe tvari), kvercetin (42 µg/ g suhe tvari) i galnu kiselinu (1-6 µg/g suhe tvari), ali su isto tako detektirani spojevi kampferol i miricetin koji nisu dokazani u istraživanim uzorcima, međutim treba uzeti u obzir da se radi o fenolnom profilu crnog vina. Galna kiselina (13,4 mg/100g suhe tvari), kvercetin (62 mg/100g suhe tvari) te kava kiselina (12,8 mg/100g suhe tvari) su također detektirani u ekstraktu taloga crnog vina sorte *Blatina* u istraživanju Jurčevića i sur. (2017). [15,19]

Ono što se može uočiti je da se ekstrakti taloga zaostali nakon vinifikacije rijetko spominju u literaturi što otežava usporedbu dobivenih rezultata, osobito kada je riječ o

bijelim vinima. Od dobivenih rezultata u ovom radu može se još istaknuti prisustvo vanilina, tirozola, fluoroglucinola i naringenina.

**Tablica 5.** Fenolni profil testiranih uzoraka određen HPLC metodom

Fenolni spoj (mg/L)	Uzorak 1	Uzorak 2
Fluoroglucinol	21,126 ± 0,173	9,894 ± 0,457
Galna kiselina	12,18 ± 0,137	5,141 ± 0,184
Protokatehinska kiselina	14,393 ± 0,023	3,515 ± 0,127
Tirosol	20,141 ± 1,342	21,2945 ± 0,972
<i>p</i> -hidroksi benzojeva kiselina	64,116 ± 2,184	29,402 ± 0,004
Katehin hidrat	10,4095 ± 0,581	5,168 ± 0,199
Klorogenska kiselina	2,727 ± 0,472	0,955 ± 0,011
Gentisinska kiselina	13,3295 ± 0,112	8,221 ± 0,017
Kava kiselina	2,8285 ± 0,022	5,611 ± 0,000
Siriginska kiselina	7,488 ± 0,397	2,9385 ± 0,026
Epikatehin	20,0785 ± 0,646	4,588 ± 0,059
Epigalokatehin galat	12,4125 ± 0,439	2,917 ± 0,028
Vanilin	2,754 ± 0,537	1,294 ± 0,274
<i>t-p</i> -kumarinska kiselina	0,3725 ± 0,066	0,3765 ± 0,002
2,6-dimetoksi benzojeva	2,7625 ± 0,112	1,3635 ± 0,101
Ferulinska kiselina	1,433 ± 0,071	0,348 ± 0,001
Sinapinska kiselina	1,345 ± 0,004	0,3995 ± 0,156
<i>t-o</i> -kumarinska kiselina	5,4545 ± 0,013	1,2925 ± 0,087
Resveratrol	1,565 ± 0,028	0,762 ± 0,016
Kvercetin	6,471 ± 0,561	10,116 ± 0,017
Cimetna kiselina	4,2695 ± 0,210	3,963 ± 0,017
Naringenin	1,144 ± 1,263	0,138 ± 0,000





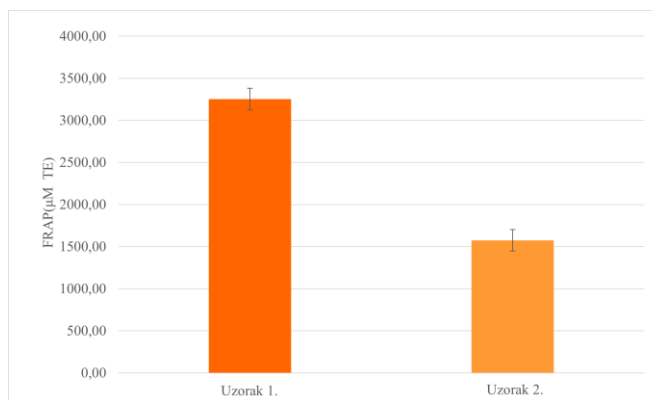
**Slika 10.** Primjer izgleda HPLC kromatograma testiranih uzoraka

Rezultati fenolnog sastava uzorka 2 ukazuju na činjenicu da je tijekom procesa fermentacije velik dio fenolnih komponenti prešao u vino, a zaostali sadržaj fenola u talogu čini ga zanimljivim nusproizvodom iskoristivim za daljnju primjenu u prehrambenoj industriji. Ono što je zanimljivo je i činjenica da nakon maceracije preostali talog se u pravilu rijetko za nešto iskoristi, a rezultati ovog rada ukazuju na njegov bogat fenolni sastav, a samim time i potencijal iskoristivosti i primjene.

### 3.2 Antioksidacijska aktivnost ekstrakata

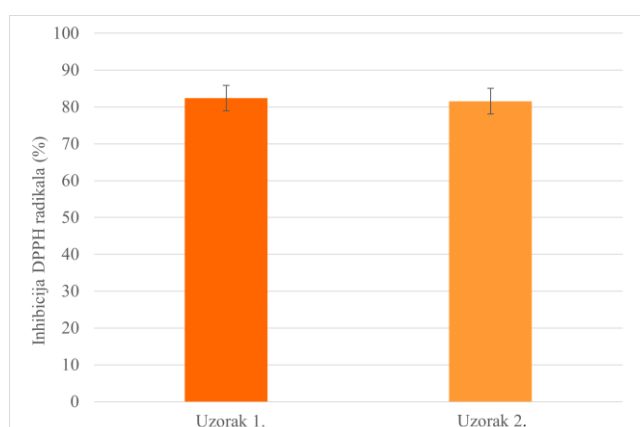
Kemijska reakcija kojom se prenosi vodik ili elektron iz tvari, uz oksidirajuće sredstvo, zove se oksidacija. Reakcija oksidacije može dati slobodne radikale koji započinju lančane reakcije i u stanicama mogu izazvati oštećenja, pa čak i smrt stanice. Antioksidansi su molekule koje zaustavljaju ove reakcije uklanjanjem slobodnih radikala. Stoga kažemo da su antioksidansi odgovorni za obranu organizma od napada slobodnih radikala. [35]

Broj i vrste antioksidacijskih metoda su brojne a neke najčešće korištene u znanstvenim studijima za određivanje antioksidacijske aktivnosti testiranih uzoraka korištene su i u ovom radu i to metoda FRAP (eng. *Ferric reducing antioxidant power*), metoda DPPH inhibicije slobodnih radikala te ORAC (eng. *Oxygen radical absorbance capacity*) metoda. [35]



**Slika 11.** Rezultati određivanja antioksidacijske sposobnosti FRAP metodom

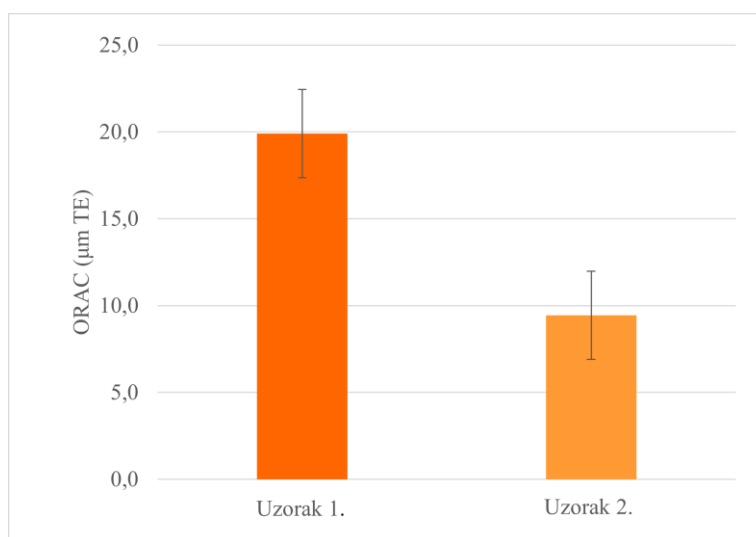
Rezultati određivanja FRAP metodom prikazani su na slici 11 i kao što je i očekivano u korelaciji su sa sadržajem ukupnih fenola u uzorcima. Dakle, uzorak 1 je pokazao veću redukcijsku sposobnost (3251,92 µM TE) u odnosu na uzorak 2 (1575 µM TE). Usporedbom dobivenih rezultata s rezultatima antioksidacijske aktivnosti bijelih vina, slično kao i kod ukupnih fenola, vina pokazuju nešto niži antioksidacijski potencijal. U istraživanju Mitrevske i sur. (2020) podaci za FRAP antioksidacijsku aktivnost bijelog vina makedonskih sorti *Smederevka*, *Temjanika*, *Žilavka* bili su u rasponu od 0,95-1,07 mmol TE/L. [33]



**Slika 12.** Rezultati određivanja antioksidacijskog kapaciteta uzoraka DPPH metodom

Rezultati DPPH metode prikazani su na slici 12 i izraženi su kao postotak inhibicije DPPH radikala. Antioksidacijski kapacitet uzorka 1 iznosio je 82,37%, dok je uzorak 2 imao 81,55%.

Tingting i sur. (2014) u svom istraživanju ispitali su antioksidacijski kapacitet za različite vrste bijelog vina (*Semillon*, *Ugni blanc*, *Chardonnay*, *Italian Riesling*, *Chenin blanc*) te su prikazali vrijednosti od 510,13 do 603,15 M za DPPH metodu. [36] Obzirom na razlike u metodi i načinu iskazivanja dobivenih rezultata ne možemo donijeti zaključak da li su rezultati ovog rada imali bolji oksidacijski kapacitet u odnosu na spomenuta vina.



**Slika 13.** Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti uzoraka ORAC metodom

Kod određivanja antioksidacijske aktivnosti ORAC metodom korišteni su uzorci razrijeđeni u omjeru 1:1000. Rezultati su prikazani na slici 13 i izraženi su u µM TE. Vrijednost uzorka broj 1 iznosila je 19,9 µM TE, a vrijednost uzorka 2 9,4 µM TE, čime se još jednom potvrđuje bolja antioksidacijska aktivnost uzorka 1 što je zanimljivo obzirom da su korištene antioksidacijske metode bazirane na različitim mehanizmima djelovanja. Ovime možemo zaključiti da testirani uzorci djeluju i kao hvatači slobodnih radikala i kao redukcijska sredstva.

Bogat kemijski sastav taloga, kao i njihova antioksidacijska aktivnost dokazuju njihova pozitivna svojstva te otvaraju mogućnost daljnje primjene u prehrambenoj industriji. Pregledom znanstvene literature pronađen je mali broj istraživanja koja analiziraju taloge zaostale tijekom vinifikacije bijelog vina i uglavnom obuhvaćaju talog iz vinifikacije crnog grožđa i njegove pozitivne učinke na ljudsko zdravlje (smanjenja krvnog tlaka, sprječavanja stanja izazvanih oksidativnim stresom i sl.). [20,21] Osim dobrog antioksidacijskog učinka studije ističu i nutritivnu vrijednost taloga, a neke su potvrdile i antimikrobnu aktivnost što otvara mogućnost njegove primjene kao konzervansa.

#### 4. ZAKLJUČCI

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

- Udio ukupnih fenola u testiranim uzorcima iznosio je od 905,56 mg GAE/L do 1933,33 mg GAE/L, a najveći udio bio je prisutan u uzorku taloga nakon maceracije.
- Od pojedinih fenolnih spojeva najzastupljenije su fenolne kiseline u oba uzorka, među kojima se osobito ističe *p*-hidroksi benzojeva kiselina.
- U uzorcima je potvrđena prisutnost i flavanola katehina, epikatehina i EGCG te flavonola kvercetina.
- Potvrđena je prisutnost i stilbena resveratrola u oba testirana uzorka.
- Najveću antioksidacijsku aktivnost testiranu svim metodama (FRAP, DPPH, ORAC) pokazao je uzorak 1, odnosno talog uzorkovan nakon maceracije.
- Da bi se dokazala i potvrdila mogućnost primjene taloga kao konzervansa potrebna su dodatna istraživanja.

## 5. LITERATURA

1. R. S. Jackson. Wine Science, 4th Ed., Principles and Applications, Academic Press. 2014
2. Činjenice o bijelom vinu, Dostupno na: <https://svijetlidvori.hr/cinjenice-o-bijelom-vinu/>  
Pristupljeno: 10.5.2022
3. Vina Miljas, Konavle, Dostupno na: <https://www.dubrovniknet.hr/vina-miljas/>  
Pristupljeno: 14.5.2022
4. Slika 1. Dostupno na: [//radiosarajevo.ba/amp/magazin/zivot-i-stil/bijelo-vino-povecava-opasnost-od-razvoja-melanoma/246692](http://radiosarajevo.ba/amp/magazin/zivot-i-stil/bijelo-vino-povecava-opasnost-od-razvoja-melanoma/246692) Preuzeto 14.5.2022
5. Pravilnik o proizvodnji vina, NN 2/2005, Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodnog gospodarstva, članak 2., 2005.
6. Moštomjeri po Oechsle-u, Dostupno na: <https://www.sd-duvancic.hr/mostomjeri-po-oechsle-u/> Pristupljeno: 19.5.2022
7. Tomas D. Kolovrat D. Priručnik za proizvodnju vina, za male proizvođače i hobiste, Federalni agromediteranski zavod, Mostar, 2011.
8. Alpeza I. Temelji kemijskog sastava vina. Glasnik Zaštite Bilja. 2008; 31 (6), 143-150.
9. Kovačević Granić K. Vanzo A. Alpeza I. Total phenols, stilbene and antioxidative activity in Babić and Plavac mali wines; Efficiency of pectolytic enzymes. Glasnik zaštite bilja. 2019; 42 (5), 50-50. Dostupno na: <https://doi.org/10.31727/gzb.42.5.5>
10. USDA National Nutrient Data Base, Dostupno na: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/1104474/nutrients>
11. Čović D. Bojić M. Medić-Šarić M. Metabolizam flavonoida i fenolnih kiselina. Farmaceutski glasnik. 2009
12. Delgado AM. Issaoui M. Chammem N. Analysis of Main and Healthy Phenolic Compounds in Foods. J AOAC Int. 2019; 1;102(5):1356-1364. Dostupno na: doi: 10.5740/jaoacint.19-0128.
13. De Beer D. et al. Phenolic compounds: a review of their possible role as in vivo antioxidants of wine. South African Journal of Enology & Viticulture. 2002; 23(2):48-61, Dostupno na: doi:10.21548/23-2-2155.

14. Friedman M. Antibacterial, Antiviral and Antifungal properties of wines and winery byproducts in relation to their flavonoid content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014; 62, 6025-6024
15. Jara-Palacios MJ. Wine Lees as a Source of Antioxidant Compounds. *Antioxidants*. 2019; 16;8(2):45. Dostupno na: doi: 10.3390/antiox8020045.
16. Silva A. et al. Valorization of Winemaking By-Products as a Novel Source of Antibacterial Properties: New Strategies to Fight Antibiotic Resistance. *Molecules*. 2021; 26(8):2331. Dostupno na: <https://doi.org/10.3390/molecules26082331>
17. Proserpio C. Fia G. Bucalossi G. Zanoni B. Spinelli S. Dinnella C. Monteleone E. Pagliarini E. Winemaking Byproducts as Source of Antioxidant Components: Consumers' Acceptance and Expectations of Phenol-Enriched Plant-Based Food. *Antioxidants*. 2020; 24;9(8):661. Dostupno na: doi: 10.3390/antiox9080661
18. López-Fernández-Sobrino R. Soliz-Rueda JR. Suárez M. Mulero M. Arola L. Bravo FI. Muguerza B. Blood Pressure-Lowering Effect of Wine Lees: Dose-Response Study, Effect of Dealcoholization and Possible Mechanisms of Action. *Nutrients*. 2021; 30;13(4):1142. Dostupno na: doi: 10.3390/nu13041142.
19. Landeka I. Jurčević. Dora M. Guberović I. Petras M. Rimac S. Brnčić. Đikić D. Polyphenols from Wine Lees as a Novel Functional Bioactive Compound in the Protection Against Oxidative Stress and Hyperlipidaemia. *Food Technol Biotechnol*. 2017;55(1):109-116. Dostupno na: doi: 10.17113/ftb.55.01.17.4894.
20. López-Fernández-Sobrino R. Soliz-Rueda JR. Margalef M. Arola-Arnal A. Suárez M. Bravo FI. Muguerza B. ACE Inhibitory and Antihypertensive Activities of Wine Lees and Relationship among Bioactivity and Phenolic Profile. *Nutrients*. 2021; 20;13(2):679. Dostupno na: doi: 10.3390/nu13020679.
21. Troilo M. Difonzo G. Paradiso VM. Summo C. Caponio F. Bioactive Compounds from Vine Shoots, Grape Stalks, and Wine Lees: Their Potential Use in Agro-Food Chains. *Foods*. 2021;5;10(2) Dostupno na: doi: 10.3390/foods10020342.:342.
22. Namirnice bogate celulozom, Dostupno na: <https://vitamini.hr/blog/savjetistrucnjaka/namirnice-bogate-celulozom-8831/> Pristupljeno: 23.5.2022
23. Antonić B. Jančíková S. Dordević D. Tremlová B. Grape Pomace Valorization: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Foods*. 2020; 7;9(11):1627. Dostupno na: doi: 10.3390/foods9111627.

24. Chiavaroli A. Balaha M. Acquaviva A. Ferrante C. Cataldi A. Menghini L. Rapino M. Orlando G. Brunetti L. Leone S. Recinella L. Di Giacomo V. Phenolic Characterization and Neuroprotective Properties of Grape Pomace Extracts. *Molecules*. 2021; 14;26(20):6216. Dostupno na: doi: 10.3390/molecules26206216.
25. Katehini, Dostupno na: <https://www.jardineriaon.com/hr/katehini.html>  
Pristupljeno: 26.5.2022
26. Gupta M. Dey S. Marbaniang D. Pal P. Ray S. Mazumder B. Grape seed extract: having a potential health benefits. *J Food Sci Technol*. 2020; 57(4):1205-1215. Dostupno na: doi: 10.1007/s13197-019-04113-w
27. Kvercetin, Dostupno na: <https://www.vasezdravlje.com/hrana-i-zdravlje/kvercetin-zdravlje-cuva> Pristupljeno: 23.5.2022
28. Maia M. Cavaco AR. Laureano G. et al. More than Just Wine: The Nutritional Benefits of Grapevine Leaves. *Foods*. 2021;10(10):2251.
29. Rašić T.M. Antioksidacijski potencijal kupine, Diplomski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, 2021
30. Severović M. Kromatografija kao analitička metoda za određivanje bioloških uzoraka, Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju, 2020.
31. Di Mattia C.D. Piva A. Martuscelli M. Mastrocola D. Sacchetti G. Effect of sulfites on the in vitro antioxidant activity of wine, *Ital. J. Food Sci*. 2015; 27:4 Dostupno na: <https://doi.org/10.14674/1120-1770/ijfs.v381>
32. Tekos F. Makri S. Skaperda ZV. Patouna A. Terizi K. Kyriazis ID. Kotseridis Y. Mikropoulou EV. Papaefstathiou G. Halabalaki M. Demetrios K. Assessment of Antioxidant and Antimutagenic Properties of Red and White Wine Extracts In Vitro. *Metabolites*. 2021; 2;11(7):436. Dostupno na: doi: 10.3390/metabo11070436
33. Mitrevska K. Grigorakis S. Loupassaki S. Calokerinos AC. Antioxidant Activity and Polyphenolic Content of North Macedonian Wines. *Applied Sciences*. 2020; 10(6):2010. Dostupno na: <https://doi.org/10.3390/app10062010>
34. Zhijing Y. Shavandi A. Harrison R. Bekhit AEA. Characterization of Phenolic Compounds in Wine Lees. *Antioxidants* . 2018; 25;7(4):48. Dostupno na: doi: 10.3390/antiox7040048



35. Moharram HA. Youssef MM. Methods for Determining the Antioxidant Activity: A Review, *Alex. J. Fd. Sci. & Technol.* 2014;11(1):31-42.
36. Tingting M. Xiangyu S. Gao G.T. Wang X.Y. Liu X-Y. Du G.R. Jicheng Z. Phenolic Characterisation and Antioxidant Capacity of Young Wines Made From Different Grape Varieties Grown in Helanshan Donglu Wine Zone (China). *South African Journal for Enology and Viticulture.* 2014; 35; 321-331. Dostupno na: doi: 10.21548/35-2-1020