

# Fenolni profil i biološki potencijal nusproizvoda vinifikacije crnog i rose vina

---

**Nadilo, Antonia**

**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:167:666589>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-26**

*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 CRNOG I ROSÉ VINA**

**ZAVRŠNI RAD**

**ANTONIA NADILO**

**Matični broj: 110**

**Split, rujan, 2022.**



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

**FENOLNI PROFIL I BIOLOŠKI POTENCIJAL NUSPROIZVODA**  
**VINIFIKACIJE CRNOG I ROSÉ VINA**

**ZAVRŠNI RAD**

**ANTONIA NADILO**

**Matični broj: 110**

**Split, rujan, 2022.**

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

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

**BACHELOR TESIS**

**ANTONIA NADILO**

**Parent number: 110**

**Split, September 2022.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

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

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija  
**Tema rada** je prihvaćena na 25. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta

**Mentor:** Doc. dr. sc. Danijela Skroza  
**Pomoć pri izradi:** Mag. ing. agr. Martina Čagalj, doktorand

### FENOLNI PROFIL I BIOLOŠKI POTENCIJAL NUSPROIZVODA VINIFIKACIJE CRNOG I ROSÉ VINA

Antonia Nadilo, 110

**Sažetak:** Procesom proizvodnje vina nastaju velike količine nusproizvoda poput komine grožđa, pokožica, sjemenki i vinskog taloga. Svi ovi nusproizvodi bogati su bioaktivnim spojevima koji pokazuju brojna biološka svojstva, između ostalog izraženu antioksidacijsku aktivnost. Iako je vinski talog najslabije proučavan nusproizvod vinifikacije, poznato je da je bogat fenolnim spojevima zbog čega sve češće postaje predmetom brojnih studija koje nastoje opravdati njegovu primjenu u prehrambenoj industriji. U ovome radu ispitan je fenolni sastav i biokemijski potencijal vinskog taloga crnog i rosé vina. Ukupni fenoli određeni su metodom po Folin-Ciocalteu, dok je fenolni profil ispitan visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom, HPLC (engl. *High performance liquid chromatography*) metodom. Antioksidacijska aktivnost ispitan je korištenjem tri različite metode: FRAP (engl. *Ferric reducing antioxidant power*), DPPH (engl. *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical scavening*) i ORAC (eng. *Oxygen radical absorbance capacity*). Rezultati ukazuju na izuzetno bogat fenolni sastav taloga crnog vina u odnosu na talog rosé vina. Najdominantniji fenoli u talogu crnog vina su bili *p*-hidroksi benzojeva kiselina ( $89,2 \pm 1,1$  mg/L) i kvercetin ( $76,5 \pm 0,1$  mg/L), dok je u talogu rosé vina udio istih spojeva bio 2,5 do 12 puta niži. Najveću antioksidacijsku aktivnost testiranu FRAP i ORAC metodama pokazao je talog crnog vina, dok je DPPH metodom talog rosé vina pokazao veći antioksidacijski kapacitet.

**Ključne riječi:** vinski talog, fenolni profil, antioksidacijska aktivnost, HPLC

**Rad sadrži:** 26 stranica, 10 slika, 4 tablice, 37 literaturnih 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:** 22. rujan 2022. godine

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR TESIS

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, session no. 25

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

**Technical assistance:** Ph. D. Student, Martina Čagalj, M. Sc. in Marine Fishery

### PHENOLIC PROFILE AND BIOLOGICAL POTENTIAL OF VINIFICATION BYPRODUCTS OF RED AND ROSÉ WINE

Antonia Nadilo, 110

**Abstract:** Wine production generates a large amount of by-products such as grape pomace, skins, seeds, and wine lees. All by-products are rich in bioactive compounds that have many beneficial biological properties, including strong antioxidant properties. Although wine lees are among the least studied by-products of winemaking, they are known to be rich in phenolic compounds, and studies on their use in the food industry are increasing. In this work, the total phenols and biochemical potential of red wine and rosé wine lees were investigated. Total phenols were determined by the Folin-Ciocalteu method, while the phenolic profile was studied by high-performance liquid chromatography (HPLC). Antioxidant activity was tested by three different methods: FRAP (Ferric reducing antioxidant power), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical scavenging) and Oxygen radical absorbance capacity (ORAC). The results show that the phenolic composition of red wine lees is very rich compared to rosé wine lees. The most dominant phenols in red wine lees were p-hydroxybenzoic acid ( $89.2 \pm 1.1$  mg/L) and quercetin ( $76.5 \pm 0.1$  mg/L), while the content of these compounds in rosé wine lees was 2.5 to 12 times lower. Red wine lees showed the highest antioxidant activity by the FRAP and ORAC methods, while the results of the DPPH method were higher in the rosé wine lees.

**Keywords:** wine lees, phenolic profile, antioxidant activity, HPLC

**Thesis contains** 26 pages, 10 figures, 4 tables, 37 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

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

**Defence date:** September 22, 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 rujna 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**

Želim se zahvaliti svojoj mentorici doc. dr. sc. Danijeli Skroza na strpljenju, savjetima i velikoj pomoći tijekom izrade ovog završnog rada.

Zahvaljujem se mojim roditeljima na potpori i motivaciji tijekom cijelog studiranja te prijateljima koji su uvijek bili podrška.

Hvala!

## ZADATAK ZAVRŠNOG RADA:

Zadatak ovog završnog rada bio je:

- Pripraviti vodene ekstrakte od nusproizvoda vinifikacije crnog i rosé vina, sorte *Plavac mali*, primjenom ultrazvuka.
- Odrediti udio ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom, te HPLC (engl. *High performance liquid chromatography*) metodom fenolni profil ekstrakata.
- Antioksidacijsku aktivnost ekstrakata ispitati korištenjem tri različite metode: FRAP (engl. *Ferric reducing antioxidant power*), DPPH (engl. *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical scavenging*) i ORAC (engl. *Oxygen radical absorbance capacity*) metodom.
- Analizirati dobivene rezultate i donijeti zaključke o fenolnom sastavu i antioksidacijskom potencijalu uzoraka te mogućnosti primjene vinskog taloga u prehrambenoj industriji.

## SAŽETAK

Procesom proizvodnje vina nastaju velike količine nusproizvoda poput komine grožđa, pokožica, sjemenki i vinskog taloga. Svi ovi nusproizvodi bogati su bioaktivnim spojevima koji pokazuju brojna biološka svojstva, između ostalog izraženu antioksidacijsku aktivnost. Iako je vinski talog najslabije proučavan nusproizvod vinifikacije, poznato je da je bogat fenolnim spojevima zbog čega sve češće postaje predmetom brojnih studija koje nastoje opravdati njegovu primjenu u prehrambenoj industriji. U ovome radu ispitan je fenolni sastav i biokemijski potencijal vinskog taloga crnog i rosé vina. Ukupni fenoli određeni su metodom po Folin-Ciocalteu, dok je fenolni profil ispitan visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom, HPLC (engl. *High performance liquid chromatography*) metodom. Antioksidacijska aktivnost ispitana je korištenjem tri različite metode: FRAP (engl. Ferric reducing antioxidant power), DPPH (engl. *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical scavening*) i ORAC (eng. *Oxygen radical absorption capacity*). Rezultati ukazuju na izuzetno bogat fenolni sastav taloga crnog vina u odnosu na talog rosé vina. Najdominantniji fenoli u talogu crnog vina su bili p-hidroksi benzojeva kiselina ( $89,2 \pm 1,1$  mg/L) i kvercetin ( $76,5 \pm 0,1$  mg/L), dok je u talogu rosé vina udio istih spojeva bio 2,5 do 12 puta niži. Najveću antioksidacijsku aktivnost testiranu FRAP i ORAC metodama pokazao je talog crnog vina, dok je DPPH metodom talog rosé vina pokazao veći antioksidacijski kapacitet.

**Ključne riječi:** vinski talog, fenolni profil, antioksidacijska aktivnost, HPLC

## **SUMMARY**

Wine production generates a large amount of by-products such as grape pomace, skins, seeds, and wine lees. All by-products are rich in bioactive compounds that have many beneficial biological properties, including strong antioxidant properties. Although wine lees are among the least studied by-products of winemaking, they are known to be rich in phenolic compounds, and studies on their use in the food industry are increasing. In this work, the total phenols and biochemical potential of red wine and rosé wine lees were investigated. Total phenols were determined by the Folin-Ciocalteu method, while the phenolic profile was studied by high-performance liquid chromatography (HPLC). Antioxidant activity was tested by three different methods: FRAP (Ferric reducing antioxidant power), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical scavenging) and Oxygen radical absorbance capacity (ORAC). The results show that the phenolic composition of red wine lees is very rich compared to rosé wine lees. The most dominant phenols in red wine lees were p-hydroxybenzoic acid ( $89.2 \pm 1.1$  mg/L) and quercetin ( $76.5 \pm 0.1$  mg/L), while the content of these compounds in rosé wine lees was 2.5 to 12 times lower. Red wine lees showed the highest antioxidant activity by the FRAP and ORAC methods, while the results of the DPPH method were higher in the rosé wine lees.

**Keywords:** wine lees, phenolic profile, antioxidant activity, HPLC

# SADRŽAJ

|  |    |
|--|----|
| UVOD.....  | 1  |
| 1. OPĆI DIO .....  | 2  |
| 1.1. Crno vino .....   | 2  |
| 1.1.1. Tehnologija proizvodnje crnog vina .....                  | 3  |
| 1.1.2. Kemijski i nutritivni sastav crnih vina .....             | 4  |
| 1.2. Ružičasto ili rosé vino .....                               | 5  |
| 1.2.1. Tehnologija proizvodnje ružičastih ili rosé vina .....    | 6  |
| 1.2.2. Kemijski i nutritivni sastav ružičastih (rosé) vina ..... | 7  |
| 1.3. Fenolni profil nusproizvoda vinifikacije .....              | 8  |
| 1.4. Biološki potencijal nusproizvoda.....                       | 9  |
| 2. EKSPERIMENTALNI DIO .....                                     | 11 |
| 2.1. Reagensi i uređaji.....                                     | 11 |
| 2.2. Materijal .....   | 11 |
| 2.3. Određivanje ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom.....     | 13 |
| 2.4. Određivanje fenolnog profila HPLC metodom .....             | 13 |
| 2.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti.....                | 14 |
| 2.5.1. FRAP metoda .....   | 14 |
| 2.5.2. DPPH metoda.....  | 15 |
| 2.5.3. ORAC metoda .....   | 16 |
| 3. REZULTATI I RASPRAVA .....                                    | 17 |
| 3.1. Fenolni sastav ekstrakata vinskih taloga .....              | 17 |
| 3.2. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata vinskih taloga .....  | 20 |
| 4. ZAKLJUČCI .....   | 22 |
| 5. LITERATURA.....   | 23 |

## UVOD

Vino je jedno od najstarijih alkoholnih pića koje se proizvodi vrenjem groždanog mošta ili masulja te se prema boji dijeli na bijelo, crno i rosé vino. Kvalitetu vina određuju različiti parametri kao što su koncentracija alkohola, boja, okus, miris, gorčina, trpkost, gustoća te polifenolni sastav. Za razliku od bijelih vina koja nastaju fermentacijom groždanog soka (mošta), crna vina se dobivaju alkoholnom fermentacijom mošta u prisutnosti krutih dijelova odnosno pokožice i sjemenki, odnosno fermentacijom masulja. Rosé vina mogu se dobiti miješanjem crnog i bijelog grožđa ili pak preradom crnog grožđa tehnologijom karakterističnom za proizvodnju bijelog vina. Zbog fermentacije groždanog soka zajedno s pokožicom i sjemenkama, crno vino sadrži i do 10 puta veći udio fenolnih spojeva u usporedbi s bijelim vinom.

Brojna istraživanja su provedena kako bi se razjasnio utjecaj vina na ljudsko zdravlje te je dokazano da umjerena konzumacija vina ima zaštitni učinak na kardiovaskularni sustav i srce. Najveća korist za pozitivna svojstva pripisuje se fenolnim spojevima koji uz navedeno imaju dokazana i druga pozitivna svojstva poput antioksidativnog, protuupalnog, antikancerogenog, antimikrobnog, antivirusnog i antitrombotičkog djelovanja. Od fenolnih komponenti, kvantitativno najzastupljeniji spojevi u crnom grožđu i vinu su antocijani koji se nalaze u pokožici te flavanoli koji se nalaze u sjemenkama, dok je s kvalitativnog stajališta najznačajnija skupina stilbena u koju spada resveratrol.

Vinska industrija proizvodi velike količine nusproizvoda, samo oko 14,5 milijuna tona nusproizvoda godišnje nastaje u Europi. Nusproizvodima se smatraju komina grožđa, peteljke, talog, sjemenke, lišće i pokožica. Istraživanjima je potvrđeno da su ovi nusproizvodi dobar izvor bioaktivnih spojeva poput fenolnih spojeva te da je moguća njihova primjena u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji. Stoga je cilj ovog rada bio ispitati udio pojedinih fenolnih spojeva i biološki potencijal vinskog taloga (tzv. „feca“) koji zaostaje nakon vinifikacije grožđa sorte *Plavac mali* te opravdati njegovo daljnje korištenje u prehrambenoj industriji.

# 1. OPĆI DIO

## 1.1. Crno vino

Crno vino je jedno od najpopularnijih vrsta vina koja se dobivaju fermentacijom cijelih grozdova grožđa. Tehnologija proizvodnje i komponente grožđa, utječu na složenost crnoga vina. Kvaliteti crnog vina doprinose brojni parametri, a samo neki od njih su koncentracija alkohola, polifenolni sastav, boja, kiselost, trpkost, sadržaj neprevrelog šećera. Jedan od najbitnijih sastojaka crnih vina su fenolni spojevi koji imaju ključnu ulogu u formiranju njihove boje, okusa, mirisa te imaju i pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje. Na njihovu koncentraciju u vinima utječe sorta grožđa, vrijeme trajanja maceracije, način prerade te način skladištenja. Najznačajniji antioksidansi među fenolnim spojevima koji se nalaze u crnom vinu su katehini, resveratrol, epikatehini i proantocijanidi. (1,2,3)

Najpopularnija crna vina u Hrvatskoj su: Babić, Dingač, Merlot, Plavac Mali, Pinot crni i Teran. (4)



Slika 1. Crno vino (5)

### 1.1.1. Tehnologija proizvodnje crnog vina

Tehnologija proizvodnje crnih vina uključuje slijedeće faze prerade: muljanje-runjenje grožđa, sumporenje masulja, dodavanje selekcioniranog vinskog kvasca; maceracija masulja; fermentacija masulja; otakanje; prešanje masulja; tiho vrenje te, na koncu, otakanje mladog vina. (2,6)

Prije samog muljanja i runjenja potrebno je posvetiti veliku pažnju pregledu grožđa kako bi se uklonile oštećene ili bolestima zahvaćene bobice. (2,6) Prema Pravilniku o proizvodnji vina „*masulj*“ je zgnječeno grožđe s peteljkom ili bez nje. Muljanjem se grožđe gnječi motornim ili ručnim muljačama kako bi se oslobodio groždani sok, odnosno mošt, a runjenjem se bobice odvajaju od peteljki. Kod crnog vina vrenje se obavlja u prisustvu čvrstih dijelova grožđa, soka i bobica zajedno, ali u najčešće bez peteljki jer se iz njih izlučuje velika količina tanina koja bi vinu dala vrlo oporan okus. (2,6)

Sljedeći korak je dodatak sumporenje masulja, kako bi se spriječila oksidacija, uništile octene bakterije i nepoželjni kvasci te potaklo jače izlučivanje boje. Sumporni dioksid se veže i s pojedinim sastojcima vina pa tako utječe na njegov miris i okus. Sumporenje mošta i masulja ne smije se vršiti za vrijeme fermentacije kako ne bi došlo do njegovog zastoja. (6,7)

Nakon sumporenja dodaje se selekcionirani vinski kvasac koji provodi fermentaciju te osigurava zdravo provrelo vino. Za vinsku proizvodnju najznačajniji su kvasci iz roda *Saccharomyces* koji razgradnjom šećera proizvode alkohol, toplinu i ugljikov dioksid. (7)

Maceracija masulja je jedan od koraka koji su proizvoljni u proizvodnji crnih vina. Osnovni cilj ovog postupka je izdvajanje tvari boje, arome i tanina iz pokožice i sjemenki u groždani sok. Maceracija može biti duža i kraća, ovisno o tipu vina koji se želi dobiti. Ukoliko se želi dobiti mlado crno vino namijenjeno brzom potrošnji koristi se kraća maceracija. Takva vina karakterizira fina aroma i manja koncentracija polifenola. Vina namijenjena starenju podvrgavaju se dužoj maceraciji te imaju veću količinu tanina i bolju strukturu. (2)

Alkoholna fermentacija je niz složenih biokemijskih reakcija kojima se šećer iz grožđa djelovanjem kvasaca pretvara u alkohol etanol. Glavni proizvodi alkoholne fermentacije su stoga etanol i ugljikov dioksid (CO<sub>2</sub>), ali nastaju i sporedni produkti koji mogu doprinijeti kvaliteti vina. Na alkoholnu fermentaciju utječu koncentracija šećera i



sumporovog dioksida, dostupnost kisika te temperatura ( optimalna 25-30 °C za djelovanje vinskog kvasca). Alkoholna fermentacija sastoji se od dvije odvojene faze, a to su glavno ili burno vrenje i naknadno ili tiho vrenje. Prvo nastupa period burnog vrenja. Formiraju se velike količine kvašćeve biomase kako bi se istovremeno mogle razgraditi velike količine šećera. Burnim vrenjem dolazi do naglog pada šećera, porasta temperature i jakog pjenušanja zbog velikih količina oslobođenog CO<sub>2</sub>. Nakon 5-8 dana se obično vrši otakanje mladog vina. (2,7)

Otakanje je odvajanje mladog vina od tropa u drugu posudu u kojoj će se odvijati tiho vrenje obzirom da isti sadrži dio neprevrelog šećera. Ostatak krutih dijelova odlazi na prešanje kako bi se dodatno bolje izdvojilo preostalo vino koje se potom pomiješa s prethodno otečenim vinom. Postupak prešanja potrebno je izvesti u što kraćem vremenu kako bi se izbjegla nepoželjna oksidacija. (6,7)

Period tihog vrenja mošta karakterizira pad temperature i oslabljeno pjenušanje zbog slabijeg oslobađanja CO<sub>2</sub>, a može trajati 20-30 dana. U ovom periodu fermentacija se privodi kraju, aktivnost kvašćevih stanica je smanjena zbog smanjene koncentracije šećera, odnosno zbog povećane koncentracije alkohola. (6,7)

Prestankom fermentacije na dnu posude ostaje talog koji ima negativni učinak na vino jer može dovesti do razvijanja stranih i neugodnih mirisa i okusa te sumporovodika zbog čega je mlado vino potrebno vrlo brzo odvojiti od taloga. (6,7)

### **1.1.2. Kemijski i nutritivni sastav crnih vina**

Kemijski sastav vina čine voda, etanol, glicerol, viši alkoholi, polisaharidi, organske kiseline, fenoli, minerali i hlapljive komponente. Glavni sastojak vina je voda na koju otpada oko 85%, a njena važnost je u tome što je otapalo za kiseline, alkohol i soli. (1,3,8)

Drugi najzastupljeniji sastojak vina je alkohol (12-15%). U vinu postoji više različitih alkohola koji se mogu podijeliti na alifatske i aromatske alkohole. Osnovni proizvod alkoholne fermentacije šećera je alifatski alkohol etanol. Glicerol je također jedan od bitnijih sastojaka vina jer doprinosi kvaliteti, slatkoći, harmoničnosti i viskoznosti. (2,3)

Organske kiseline su grupa spojeva odgovorna za okus vina. Vinska kiselina je dominantna pa se sadržaj ukupnih kiselina izražava preko nje, a ostale važnije organske kiseline u vinu su jabučna, limunska, mliječna, askorbinska i jantarna kiselina. (8,9)

Terpeni su spojevi koji su prisutni u vinu u malim koncentracijama, međutim imaju veliki utjecaj na njegova organoleptička svojstva. U grožđu i vinu je identificirano preko 50 terpenskih spojeva. Od ostalih sastojaka crnog vina, fenolni spojevi imaju važnu ulogu za njegovu kvalitetu, aromu i boju. Flavonoidi su najvažnija skupina spojeva u crnom vinu, njihova koncentracija u vinu može biti i do 800 mg/L, a značaj je u tome što doprinose boji, oporosti i gorčini vina. Tanini su jedinstveni spojevi prisutni u crnom vinu koji nastaju kondenzacijom flavonola, a tijekom starenja njihova koncentracija raste čime se pojačava trpkost vina. (3)

Koncentracije fenolnih kiselina kreću se od 60 do 566 mg/L u crnom vinu. Neke od značajnih fenolnih kiselina u crnom vinu su gentisinska, salicilna, galna i siriginska kiselina. Stilbeni su neflavanoidni spojevi prisutni u crnom vinu, a najpoznatiji stilben je resveratrol. (3)

**Tablica 1.** Prosječni kemijski i nutritivni sastav 100 grama crnog vina (10)

| Nutrijenti     |         | Vitamini     |          | Minerali |         |
|----------------|---------|--------------|----------|----------|---------|
| Voda           | 86,5 g  | Vitamin C    | 0 mg     | Kalcij   | 8 mg    |
| Energija       | 85 kcal | Tiamin       | 0,005 mg | Željezo  | 0,46 mg |
| Proteini       | 0,07 g  | Riboflavin   | 0,031 mg | Magnezij | 12 mg   |
| Ukupne masti   | 0 g     | Niacin       | 0,224 mg | Fosfor   | 23 mg   |
| Pepeo          | 0,28 g  | Vitamin B-6  | 0,057 mg | Kaliji   | 127 mg  |
| Ugljikohidrati | 2,61 g  | Vitamin B-12 | 0 µg     | Natrij   | 4 mg    |
| Vlakna         | 0 g     | Vitamin A    | 0 µg     | Cink     | 0,14 mg |

## 1.2. Ružičasto ili rosé vino

Ružičasto ili rosé vino je vrsta vina koja sadrži dio boje pokožice grožđa, ali nedovoljno za kvalifikaciju kao crno vino. Posebnim ga čini to što vino nije ni crveno ni bijelo. Iako bojom više nalikuje crnom vinu okusom je rosé sličniji bijelom. Kada se prozirni, svježe cijedjeni sok crnog grožđa kratko izloži kontaktu s pokožicom, poprimit će ružičasti ton. Na taj način nastaju različite boje rosé-a (boje breskve, trešnje ili maline), ovisi o duljini trajanja kontakta vina s pokožicom grožđa. (11,12)

Rosé se može praviti kao pjenušavo, polu pjenušavo ili mirno vino sa širokim rasponom slatkoće i arome, poput arome jagode, maline, citrusa, lubenice te cvjetne arome. (11)

Dva su načina dobivanje rosé vina. Prvi način je miješanje crnog i bijelog vina, a drugi prerada crnog grožđa tehnologijom za dobivanje bijelog vina tj. postupcima koji uključuju muljanje, cijedenje i tiješnjenje te odvajanje mošta od komine prije same fermentacije. (13)



Slika 2. Rosé vina (14)

### **1.2.1. Tehnologija proizvodnje ružičastih ili rosé vina**

Tehnologija proizvodnje kojom se dobivaju rosé vina svjetlijih nijansi, slična je proizvodnji bijelih vina. Postupak se sastoji od muljanja i runjenja crnog grožđa, nakon čega se masulj sumpori i odvodi na ocjeđivanje kojim se dobiva samotok vrlo svijetle boje. Sljedeći korak je prešanje ocijeđenog masulja, združivanje samotoka i preševine koji potom zajedno idu na fermentaciju. (15)

Tehnologija proizvodnje kojom se dobivaju rosé vina tamnijih nijansi ružičaste boje, koja može čak biti i do crvene boje, sličnija je proizvodnji crnih vina. Tehnologija proizvodnje sastoji se od muljanja grožđa, podvrgavanja masulja maceraciji, odvođenja masulja na ocjeđivanje i prešanje. Maceracija pri niskim temperaturama omogućava izdvajanje boje iz pokožice koja prelazi u sok, traje 3-24 sata, a što je maceracija duža dobivaju se rosé vina intenzivnijih obojenja. (15)

### 1.2.2. Kemijski i nutritivni sastav ružičastih (rosé) vina

Kemijski sastav rosé vina ovisi o tehnologiji proizvodnje te o sorti grožđa koja se koristi za proizvodnju. Iako su podaci o sastavu i čimbenicima ružičastih vina ograničeni, prosječne vrijednosti su uglavnom sljedeće: 13,1% alkohola, 6,3 g/L ukupnih kiselina, 22,9 g/L ukupnih ekstrakta, 109,4 mg SO<sub>2</sub> i pH 3,28. (16)

Kvantitativnom analizom *Grenache* rosé vina utvrđena je prisutnost 28 polifenola čiji se omjer značajno razlikovao od polifenola u crnom vinu dobivenog od iste sorte grožđa. Glavni fenolni spojevi su hidroksicimetne kiseline, a u manjim količinama su prisutni antocijani, flavanoli, hidroksibenzojeve kiseline, flavonoli, stilbeni i dihidroflavonoli. Najznačajniji derivati hidroksicimetne kiseline pronađeni u rosé vinu su kutarska kiselina, kava kiselina i *p*-kumarinska kiselina. Od flavanola najznačajniji su katehin i epikatehin dok su od flavonola to bili derivati kvercetina i u manjim količinama miricetin glikozidi. Veća koncentracija fenolnih kiselina i antocijana uzrokuje intenzivnije ružičasto obojenje te nižu pH vrijednost. (17)

Veliku količinu spojeva u rosé vinu čine etil i acetatni ester koji su povezani s voćnom i cvjetnom aromom vina. Među brojnim alkoholima posebno se ističe 2-feniletanol za koji se smatra da je odgovoran za ružičaste note u vinu. Spojevi koji također doprinose aromi su limonen, linalol, β-citronol, α-terpineol i β-damascenon koji je poznatiji kao keton ruže. U rosé vinima mogu biti prisutne i neke hlapljive masne kiseline koje mogu imati negativni učinak na specifičnu aromu rosé vina. (18)

**Tablica 2.** Prosječni kemijski i nutritivni sastav 100 grama rosé vina (10)

| Nutrijenti   |         | Vitamini     |          | Minerali |         |
|--------------|---------|--------------|----------|----------|---------|
| Voda         | 86,4 g  | Vitamin C    | 0 mg     | Kalcij   | 10 mg   |
| Energija     | 83 kcal | Tiamin       | 0,02 mg  | Željezo  | 0,2 mg  |
| Proteini     | 0,36 g  | Riboflavin   | 0,015 mg | Magnezij | 10 mg   |
| Ukupne masti | 0 g     | Niacin       | 0,09 mg  | Fosfor   | 18 mg   |
| Pepeo        | 0,16 g  | Vitamin B-6  | 0,037 mg | Kalij    | 59 mg   |
| Glukoza      | 1,7 g   | Vitamin B-12 | 0,01 μg  | Natrij   | 5 mg    |
| Fruktoza     | 2,1 g   | Vitamin A    | 0 μg     | Cink     | 0,11 mg |

### 1.3. Fenolni profil nusproizvoda vinifikacije

Fenolni spojevi su velika i kompleksna grupa kemijskih spojeva u vinu koji ne samo da utječu na kvalitetu vina, već i doprinose održavanju ljudskog zdravlja. Sastav fenolnih spojeva u grožđu ovisi o vrsti, uzgoju, klimatskim uvjetima, izloženosti suncu te uvjetima tla, dok profil fenolnih spojeva u vinu ovisi o fenolnom sastavu grožđa, njihovoj kemijskoj modifikaciji tijekom sazrijevanja, stupnju ekstrakcije fenolnih spojeva tijekom vinifikacije te promjenama tijekom fermentacije i starenja vina. Fenolne spojeve možemo podijeliti na flavonoide i neflavonoide. (19)

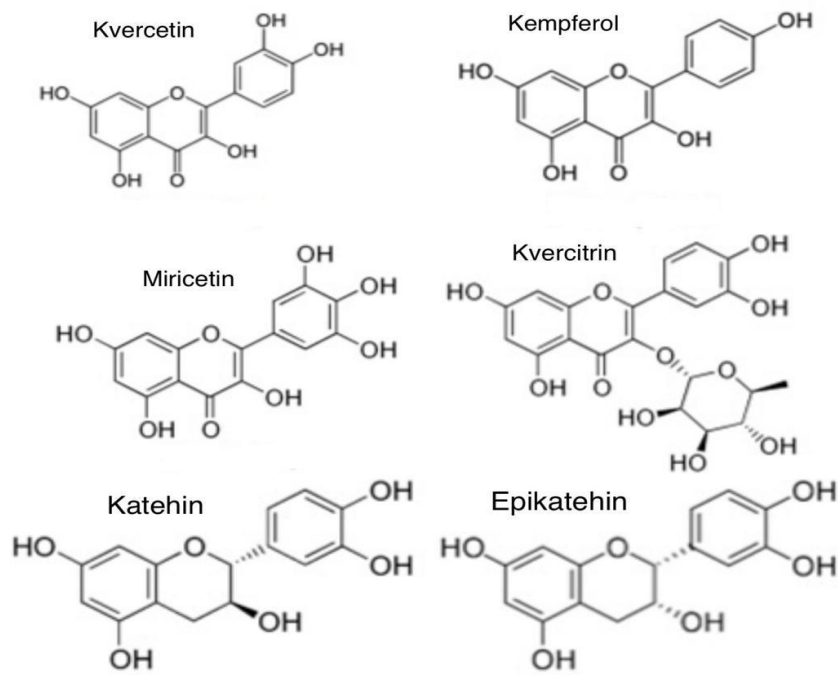
Procesom vinifikacije nastaju velike količine nusproizvoda u koje ubrajamo kominu grožđa, sjemenke, peteljke i talog, a zahvaljujući bogatom sastavu fenolnih komponenti u njima, smatraju se važnim izvorom bioaktivnih spojeva s dobrim antioksidacijskim djelovanjem. (20,21)

Nakon proizvodnje vina, zaostaje oko 20% komine grožđa koju čine sjemenke, pokožica i peteljkovina. Istraživanjima je utvrđeno da komina sadrži fenolne kiseline, flavonoide, tanine, lignane, stilbene, te da sjemenke sadrže više fenolnih spojeva od pokožice grožđa. Antocijani su kvantitativno najzastupljeniji polifenoli u pokožici, a flavanoli u sjemenkama i peteljkama. (21,22,23)

Sjemenke grožđa bogat su izvor linolne kiseline, resveratrola i oligomernih procijanidina, a dodatni izvor bioaktivnih fenolnih spojeva može se naći u peteljkama i listovima grožđa. Stabljike sadrže *trans*-resveratrol, flavan-3-ole, fenolne kiseline, a lišće sadrži flavonole, flavone i stilbene. (24)

Vinski talog, zaostao nakon fermentacije vina, sastoji se uglavnom od mrtvih kvasaca, vinske soli, istaloženih tanina, slobodnih fenola te ostalih organskih i anorganskih tvari. Vinski talog je bogat fenolnim spojevima poput flavonoida (flavanoli, antocijani, flavonoli), fenolnih kiselina i stilbena. Najzastupljeniji flavonol je kvercetin dok se kempferol i miricetin nalaze u manjim količinama. (25,26,27)

Vinski talog zbog svog bogatog fenolnog sastava ima veliki potencijal za primjenu u kozmetičkoj, farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. (26)



Slika 3. Kemijske strukture nekih fenolnih spojeva identificiranih u vinskom talogu (19)

#### 1.4. Biološki potencijal nusproizvoda

Vino je jedna od namirnica koja ima veliki utjecaj na zdravlje potrošača, a to svojstvo se u velikoj mjeri može pripisati fenolnim spojevima koji imaju antioksidativna, protuupalna, antimikrobna, antikancerogena svojstva i brojna druga djelovanja. (23)

Procesom vinifikacije nastaju velike količine nusproizvoda čija akumulacija može izazvati ekološki i ekonomski problemi zbog kiselog pH, prisutnosti organskih tvari, teških metala, itd.. Znanstvenim istraživanjima nusproizvoda, zahvaljujući njihovim dokazanim biološkim i nutritivnim svojstvima, utvrđena je mogućnost njihove primjene u prehrambenoj, kozmetičkoj, farmaceutskoj industriji, ali i mogućnost korištenja kod gnojidbe tla ili kao biomase za proizvodnju energije. (20)

Komina grožđa sadrži važne biološke spojeve poput proteina, šećera, pektina, prehrambenih vlakana, hlapljivih spojeva i minerala. Može se koristiti kao prirodni dodatak u prehrambenoj industriji zbog antimikrobnog i antioksidativnog djelovanja, te za poboljšavanje hranjive vrijednosti namirnica, ali i kao sredstvo za stvrdnjavanje ili punilo u formulama za pakiranje hrane. (20,22)

Oko 5% ukupne težine taloga čini vinski kvasac,. Peteljka grožđa koja se uklanja prije fermentacije kako bi se izbjegla prevelika trpkost vina je osim fenolnih spojeva bogata i lignoceluloznim spojevima poput celuloze, lignina i hemiceluloze. (20)

Sjemenke grožđa sadrže važne biološke spojeve poput vitamina E, fitosterola, vlakana, fenolnih spojeva, proteina, ugljikohidrata, lipida, minerala te melantonina. Dokazano je da sjemenke sprječavaju ili inhibiraju pojavu nekih vrsta raka, mikrobnih upala i razvoja degenerativnih bolesti. (20,22)

Ekstrakti lišća vinove loze pokazuju antioksidativne učinke, smanjuje peroksidaciju lipida u jetri i bubrezima te pozitivno djeluju na bol, krvarenje, visoki krvni tlak i kontrolu upalnih poremećaja. Lišće je našlo primjenu u kozmetičkoj industriji jer predstavljaju važan izvor organskih kiselina i polifenola. (20,27)

Vinski talog se sastoji od krute i tekuće frakcije. Tekuću frakciju čine etanol i organske kiseline (mliječna i octena kiselina), dok je čvrsta frakcija kombinacija stanica kvasaca, organskih kiselina (vinska kiselina), fenola, anorganskih soli, proteina, lignina i netopljivih ugljikohidrata poput celuloze i hemiceluloze. Vinski talog je bogat fenolnim spojevima i vlaknima, pH mu je između 3 i 6, razina kalija iznad 30 000 mg/L. Zbog navedenog smatra se dobrom je zamjenom za sintetske aditive jer ga odlikuje bolji antioksidacijski kapacitet nego li natrijev askorbat. Osim antimikrobnog i antioksidacijskog djelovanja vinskom talogu su dokazana i druga brojna pozitivna biološka svojstva kao što su protuupalna i kardioprotektivna aktivnost. (20,27,28)

## **2. EKSPERIMENTALNI DIO**

### **2.1. Reagensi i uređaji**

#### **Reagensi**

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

#### **Uređaji**

Mlinac za kavu, Joy Delimano, (Zagreb, Hrvatska)

Uređaj za ultrazvučnu ekstrakciju, Ultrasonic cleaner, (UK)

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

Analitička vaga, Kern 572, Model ALS 120-4 (Kingston, UK)

Mikrotitarski čitač pločica, Tecan MicroPlates Reader, model Sunrise, Tecan Group Ltd, (Mannedorf, Švicarska)

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

Mikrotitarske pločice, nesterilne, (Sarsted, Njemačka)

Uređaj za HPLC-DAD Ultimate 3000 (Termo Fischer Scientific, Waltham, MA, SAD)

### **2.2. Materijal**

U eksperimentalnom dijelu ovog završnog rada korišteni su uzorci vinskog taloga uzorkovanog tijekom procesa vinifikacije crnog grožđa sorte *Plavac mali*. Vinifikacija je provedena u podrumu Srednje škole „Braća Radić“ u Kaštel Štafiliću 2021. godine. Vinski talog crnog vina uzorkovan je nakon prvog pretoka kojem je prethodila provedena maceracija (6 dana), alkoholna fermentacija (7 dana) masulja, te tiho vrenje (doviranje 2 tjedna). Vinski talog rosé vina uzorkovan je također nakon prvog pretoka, ali u ovom slučaju nije provedena maceracija, fermentacija je trajala 7 dana, te tiho vrenje 2 tjedna.

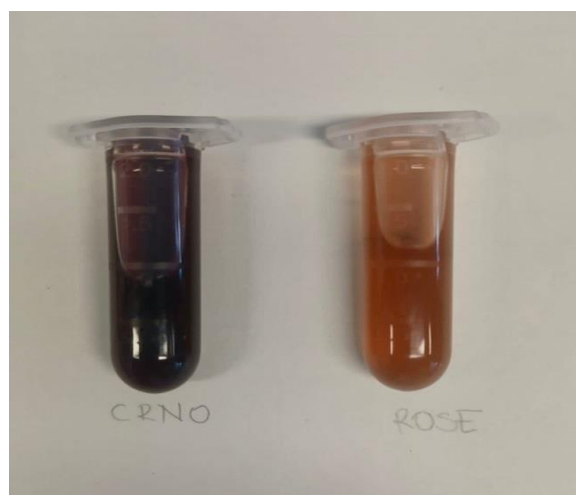


Nakon uzorkovanja, talozi su pohranjeni u zamrzivač na  $-20^{\circ}\text{C}$  do analiza. Prije ekstrakcije talozi su osušeni pri  $60^{\circ}\text{C}$  u sušioniku do konstantne mase, a potom homogenizirani korištenjem električnog mlinca.



Slika 4. Homogenizirani uzorci taloga crnog (lijevo) i rosé (desno) vina

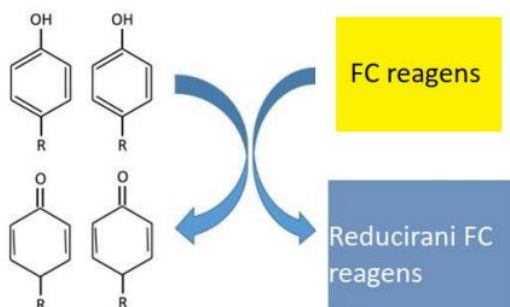
Nakon homogenizacije odvagano je 2 g pojedinog uzorka u Falcon epruvetu te je u svaku dodano 10 mL 50%-tnog etanola. Uzorci su stavljeni u ultrazvučnu kupelj gdje je provedena ekstrakcija u trajanju od 1 sata pri  $60^{\circ}\text{C}$  i 40 kHz. Nakon ekstrakcije uzorci su filtrirani preko naboranog filter papira. Filtrat je potom razrijeđen u omjeru 1:10 i kao takav korišten u daljnjim analizama.



Slika 5. Razrijeđeni uzorci ekstrakata vinskog talog

### 2.3. Određivanje ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom

Za određivanje udjela ukupnih fenola koristila se Folin-Ciocalteu metoda kojom se mjeri ukupna koncentracija fenolnih spojeva koji s navedenim reagensom tvore plavo obojeni kompleks. Intenzitet nastalog obojenja, koji ovisi o koncentraciji fenolnih spojeva, mjeri se spektrofotometrijski pri 765 nm. (29)



Slika 6. Redukcija Folin-Ciocalteu reagensa djelovanjem fenolnih spojeva (30)

#### *Postupak:*

U kivete od 10 mm odpipetira se 25  $\mu\text{L}$  uzorka, doda 1,5 mL destilirane vode i 125  $\mu\text{L}$  reagensa Folin-Ciocalteu. Promiješanoj otopini se nakon 1 minute doda 375  $\mu\text{L}$  20%-tne otopine natrijeva karbonata ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) i 475  $\mu\text{L}$  destilirane vode. Nakon što su uzorci stajali u tami 2 sata pri sobnoj temperaturi očitana im je absorbancija na spektrofotometru pri valnoj duljini od 765 nm. Rezultati su izraženi u ekvivalentima galne kiseline po litri uzorka budući je standardizacija izvršena s galnom kiselinom. U ovom slučaju analiza je provedena u 4 ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD).

### 2.4. Određivanje fenolnog profila HPLC metodom

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti ima najširu primjenu u analizi polifenolnih spojeva. Kod HPLC metode vrlo je važan odabir kolone, pokretnih faza i načina eluiranja. Ovaj sustav sadrži pumpu koja potiskuje mobilnu fazu i analit kroz stupac te detektor koji služi za mjerenje vremena zadržavanja analita i prikazivanje njegovih UV/VIS spektroskopskih karakteristika. (31,32)

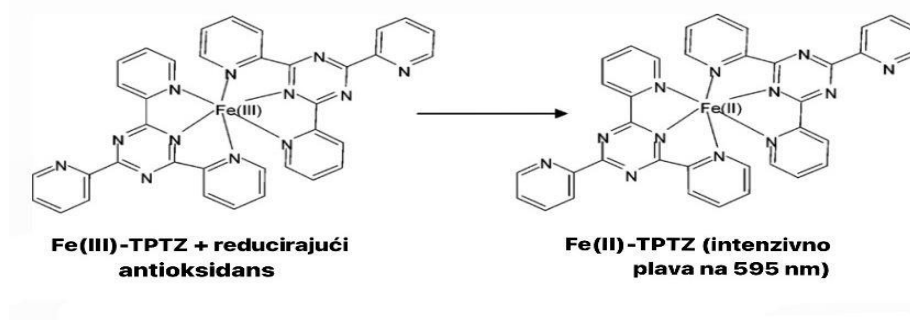
*Postupak:*

Kod određivanja fenolnog profila koristio se uređaj HPLC-UV/VIS Nexera LC-40 (Shimadzu, Kyoto, Japan) i odgovarajući program za obradu podataka. Korištena kromatografska kolona je Phenomenex C18 (250 × 4,6 mm, veličine čestica 5 μm) (Phenomenex, California, USA). U radu su korištene mobilna faza A (voda/fosfatna kiselina, 98:2, v/v) i mobilna faza B (acetonitril) pri protoku od 1,0 mL/min. Volumen injektiranog uzorka je 10 μL, temperatura kolone je 30 °C, a detekcija je izvršena pri valnim duljinama od 220 i 320 nm.

## 2.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

### 2.5.1. FRAP metoda

FRAP metoda se temelji na redukciji žutog kompleksa Fe<sup>3+</sup> iona -TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-tirazin) u Fe<sup>2+</sup>-TPTZ djelovanjem antioksidansa prisutnih u uzorcima. Redukcijom Fe<sup>3+</sup> - TPTZ kompleksa nastaje plavo obojeni kompleks čija se redukcija prati mjerenjem absorbancije pri 593 nm. (29,31)



Slika 7. Reakcija redukcije kod FRAP metode (33)

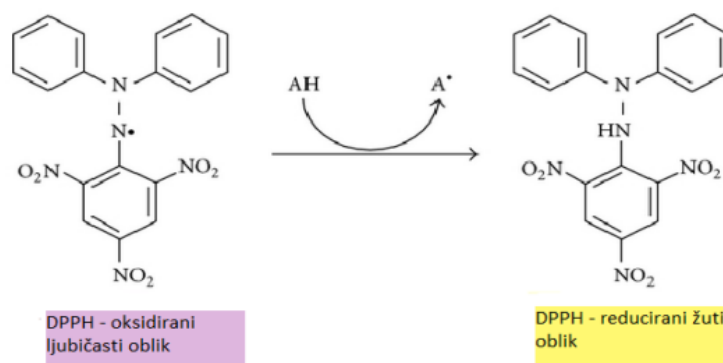
*Postupak:*

Otpipetira se 300 μL svježe pripremljene otopina FRAP reagensa u otvore mikrotitarske pločice te joj se očita absorbancija pri 592 nm. Zatim se u reagens doda 10 μL uzorka i prati promjena absorbancije nakon 4 minute. Promjena absorbancije računa se kao razlika između konačne vrijednosti nakon 4 minute te absorbancije FRAP reagensa prije dodatka

uzorka. Dobivene vrijednost se usporede s vrijednostima dobivenih za otopinu standarda, koja je u ovom slučaju Trolox. Mjerenja su provedena u 4 ponavljanja i rezultati su izraženi kao  $\mu\text{M}$  Trolox ekvivalenata (TE).

### 2.5.2. DPPH metoda

DPPH metoda koristi se za procjenu antioksidativne aktivnosti spojeva prisutnih u ekstraktima ili drugim biološki važnim izvorima, a temelji se na sposobnosti uklanjanja radikala djelovanjem antioksidansa. Zbog delokalizacije elektrona DPPH radikal je stabilan te ne dimerizira kao ostali slobodni radikali, a navedeno također uzrokuje i ljubičasto obojenje s maskimalnom apsorpcijom pri 520 nm. Reakcijom antioksidansa i DPPH radikala dolazi do redukcije koja dovodi do gubitka ljubičaste boje pri čemu nastaje blijedo-žuto obojenje. (29,31)



Slika 8. Reakcija DPPH radikala i antioksidansa (30)

#### Postupak:

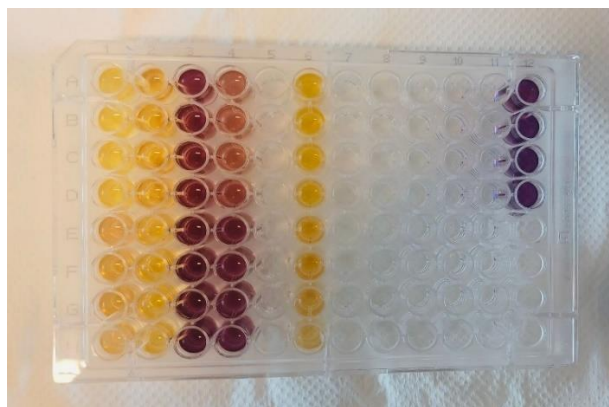
Doda se 290  $\mu\text{L}$  otopine DPPH u otvore mikrotitarske pločice te se očita njena absorbancija pri 517 nm. Nakon toga u otvore se doda 10  $\mu\text{L}$  uzorka i nakon jednog sata se ponovno izmjeri absorbancija uzorka. Mjerenje je provedeno u 4 ponavljanja, a rezultati su prikazani kao % inhibicije DPPH radikala koji se računa prema izrazu:

$$\text{Inhibicija (\%)} = \left( \frac{AC(0) - AA(t)}{AC(0)} \right) \times 100$$

gdje je

AC(0) apsorbancija DPPH radikala pri  $t = 0$ ;

AA(t) apsorbancija nakon vremena  $t$  (1 h)



Slika 9. Mikrotitarska pločica korištena kod DPPH metode

### 2.5.3. ORAC metoda

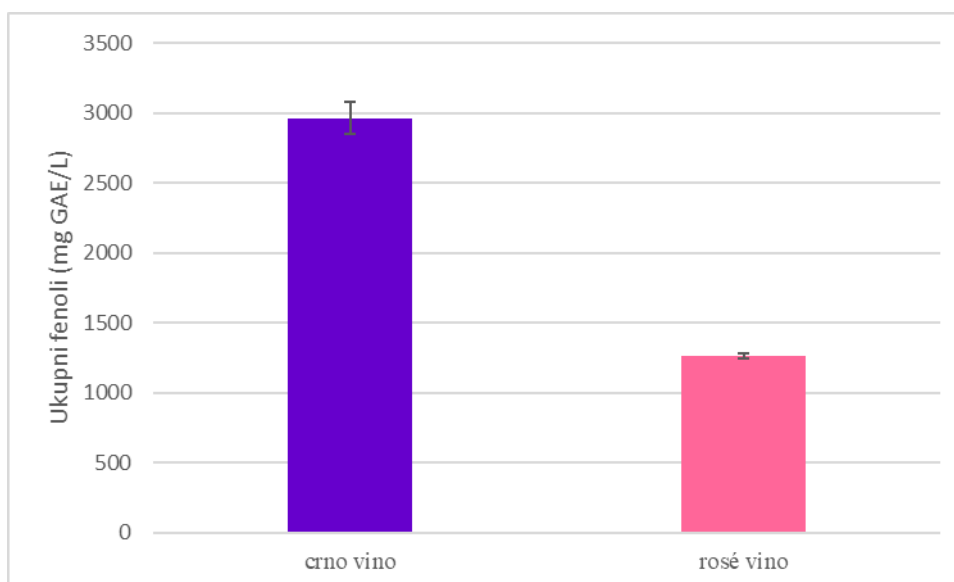
ORAC metoda temelji se na antioksidacijskoj sposobnosti spoja da inhibira slobodni peroksil radikal. Antioksidativno mjerenje prati se kao smanjenje intenziteta fluorescencije u prisutnosti antioksidansa. Kao generator slobodnih radikala koristi se kemijski spoj 2,2'-azobis (2-amidinopropan)-dihidroklorid (AAPH), čijim raspadom nastaje peroksilni radikal koji oksidira fluorescein pri čemu nastaje spoj koji ne fluorescira. Prijenosom atoma vodika antioksidansi inhibiraju oksidativnu degradaciju fluoresceinskog signala. Kao kontrola koja inhibira raspad fluoresceina koristi se Trolox, čije različite koncentracije služe za izradu baždarnе krivulje standarda s kojom se uspoređuju dobiveni rezultati. (29)

#### *Postupak:*

150  $\mu\text{L}$  fluoresceina i 25  $\mu\text{L}$  uzorka razrijeđenog 1000 puta (0,075 M fosfatnog pufera za slijepu probu), otopine standarda Troloxa dodaje se u otvore mikrotitarske pločice. Mjerenje se provodi pri 485 nm i 520 nm, a prije mjerenja uzorke i otopine reagensa treba termostatirati na 37 °C da brzina stvaranja radikala bude konstantna. Nakon termostatiranja u trajanju od 30 minuta dodaje se 25  $\mu\text{L}$  AAPH i svake minute se mjeri promjena intenziteta fluorescencije tijekom 80 minuta.

### 3. REZULTATI I RASPRAVA

#### 3.1. Fenolni sastav ekstrakata vinskih taloga



Slika 10. Grafički prikaz udjela ukupnih fenola u uzorcima vinskog taloga

Slika 10. prikazuje udio ukupnih fenola u uzorcima određenih Folin-Ciocalteu metodom. Iz grafičkog prikaza vidljiv je značajno veći udio ukupnih fenola u talogu crnog vina (2963,9 mg GAE/L) u odnosu na talog rosé vina kod kojeg je udio ukupnih fenola bio 2,3 puta manji.

U istraživanju koje su proveli Ciliberti i sur. (2022) na sortama crnog i rosé vina *Nero di Troia* ukupni fenoli sadržani u talogu crnog vina iznosili su  $21,44 \pm 0,65$  mg GAE/g suhe tvari dok je u talogu rosé vina vrijednost ukupnih fenola bila nešto viša i iznosila  $38,56 \pm 1,93$  mg GAE/g suhe tvari. (30)

Zhijing i sur. (2018) su provodeći istraživanja na sortama *Pinot Noir* utvrdili da talog crnog vina sadrži značajno veću količinu ukupnih fenola od taloga rosé vina. Ispitivanje se vršilo na šest uzoraka taloga crnog vina i dva uzorka taloga rosé vina. Ukupni fenoli crnog vina iznosili su između 17,3 i 40,9 mg GAE/g suhe tvari dok su kod rosé vina vrijednosti bile između 9,8 i 10,5 mg GAE/g suhe tvari. (34)

**Tablica 3.** Fenolni profil testiranih uzoraka određen HPLC metodom

| Fenolni spoj (mg/L)                   | Talog crnog vina | Talog rosé vina |
|---------------------------------------|------------------|-----------------|
| Galna kiselina                        | 11,5 ± 0,02      | 7,3 ± 0,01      |
| Protokatehinska kiselina              | 1,2 ± 0,1        | 4,8 ± 0,1       |
| Tirosol                               | 56,6 ± 2         | 37,8 ± 0,1      |
| <i>p</i> -hidroksi benzojeva kiselina | 89,2 ± 1,1       | 39,9 ± 1,2      |
| Katehin                               | 9,0 ± 0,8        | 4,3 ± 0,04      |
| Klorogenska kiselina                  | 0,4 ± 0,0        | 1,4 ± 0,04      |
| Gentisinska kiselina                  | 28,1 ± 0,2       | 10,5 ± 0,3      |
| Kava kiselina                         | 3,3 ± 0,0        | 1,5 ± 0,3       |
| Siriginska kiselina                   | 8,1 ± 1,2        | 1,8 ± 0,01      |
| Epikatehin                            | 32,5 ± 11,7      | 9,5 ± 0,3       |
| Epigalokatehin galat                  | 15,7 ± 0,1       | 6,4 ± 0,1       |
| Vanilin                               | 4,7 ± 0,01       | 2,6 ± 0,02      |
| <i>t-p</i> -kumarinska kiselina       | 0,6 ± 0,2        | 0,7 ± 0,0       |
| 2,6-dimetoksi benzojeva kiselina      | 2,5 ± 0,1        | 2,1 ± 0,1       |
| Ferulinska kiselina                   | 0,8 ± 0,2        | 0,2 ± 0,01      |
| Sinapinska kiselina                   | 6,2 ± 0,2        | 0,5 ± 0,1       |
| <i>t-o</i> -kumarinska kiselina       | 17,6 ± 0,2       | 7,9 ± 0,1       |
| Resveratrol                           | 3,7 ± 0,1        | 0,9 ± 0,04      |
| Kvercetin                             | 76,5 ± 0,1       | 6,5 ± 0,01      |
| Cimetna kiselina                      | 0,3 ± 0,02       | 0,2 ± 0,01      |
| Naringenin                            | 0,3 ± 0,1        | 0,02 ± 0,0      |

Rezultati određivanja fenolnog profila uzoraka vinskog taloga, određenog HPLC tehnikom, prikazani su u tablici 3. Talog crnog vina sveukupno imao je veću koncentraciju detektiranih fenolnih spojeva u odnosu na talog rosé vina. U oba uzorka najdominantniji spoj bila je *p*-hidroksi benzojeva kiselina čija je koncentracija u ekstraktu taloga crnog vina iznosila 89,2 mg/L, a u ekstraktu taloga rosé vina 39,9 mg/L. Od drugih

fenolnih kiselina u oba uzorka se izdvajaju galna, gentsinska i *t-o*-kumarinska kiselina čije su koncentracije bile također veće kod taloga crnog vina, dok je jedino protokatehinska kiselina bila zastupljenija u talogu rosé vina. Drugi najzastupljeniji spoj u uzorku taloga crnog vina bio je flavonoid kvercetin čija je koncentracija iznosila 76,5 mg/L, dok je u talogu rosé vina njegova koncentracija bila čak 12 puta niža. Ne smije se zanemariti ni zastupljenost flavanola: katehina, epikatehina i epigalokatehin galata čija je koncentracija bila 2 do 3 puta veća u ekstraktu taloga crnog vina nego li u talogu rosé vina. U oba testirana uzorka potvrđena je prisutnost stilbena resveratrola, s tim da je 4 puta veća koncentracija pronađena u ekstraktu taloga crnog vina. Među identificiranim spojevima s jako visokom koncentracijom u oba uzorka izdvaja se i tirosol s koncentracijom 56,6 mg/L u talogu crnog vina i 37,8 mg/L u talogu rosé vina.

Istraživanjima koje je provela Jara-Palacios (2019) na uzorcima taloga crnih vina sorti *Pinot Noir* i *Merlot* potvrđena je prisutnost flavanola: kampferola, kvercetina i miricetina, od kojih je najzastupljeniji bio kvercetin (42 µg/g suhe tvari) dok je koncentracija miricetina i kampferola bila u rasponu od 10 do 8 µg/g suhe tvari. Identificirani su i katehin, epikatehin te procijanidin, te brojne fenolne kiseline poput *p*-kumarinske, kava, hidroksibenzojeve, vanilinske i galne kiseline čije su koncentracije bile u rasponu od 1 do 6 µg/g suhe tvari. (28)

Romero-Diez i sur. (2018) su u talogu crnog vina sorte *Temranilo* utvrdili da su antocijanini najzastupljeniji fenolni spojevi, dok su u manjoj količini zastupljeni miricetin, epikatehin i katehin. (26)

Istraživanjima na sorti *Blatina*, Jurčević i sur. (2017) su pak pokazali da je kvercetin najzastupljeniji polifenolni spoj s koncentracijom 62 mg/100 g suhe tvari. Visokom koncentracijom još se ističu elaginska kiselina (21,9 mg/100 g suhe tvari), *p*-kumarinska kiselina (15,8 mg/100 g suhe tvari), galna kiselina (13,4 mg/100 g suhe tvari) i kava kiselina (12,8 mg/100 g suhe tvari). (35)

Giacobbo i sur. (2019) su na sorti *Merlot* proučavali fenolni sastav taloga nakon prvog i drugog pretoka. U oba uzorka su identificirani galna kiselina, miricetin, kvercetin, kempferol-3-*o*-galaktozid, miricetin-3-*o*-glukozid i kvercetin-3-*o*-glukuronid. Kao glavni flavanoli u vinu, kvercetin i miricetin bili su prisutni u značajno višim koncentracijama od ostalih fenolnih spojeva. Što se tiče koncentracije fenolnih spojeva u talogu nakon prvog i drugog pretoka, zaključeno je da talog nakon drugog pretoka ima dvostruko veću



koncentraciju fenolnih spojeva. To vrijedi za sve spojeve osim kvercetina i kempferol-3-o-galaktozid čije su koncentracije u oba taloga bile slične. (36)

Kako je vinski talog najmanje proučavan nusproizvod vinifikacije, literaturni izvori su dosta ograničeni, a pogotovo za rosé vino. zbog čega nije bilo moguće napraviti usporedbu rezultata dobivenih u ovom radu s podacima iz literature.

### 3.2. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata vinskih taloga

Antioksidacijska aktivnost uzoraka ispitivana je FRAP, DPPH i ORAC metodom, a dobiveni rezultati prikazani su u tablici 4.

**Tablica 4.** Rezultati antioksidacijske aktivnosti testiranih uzoraka.

| Vinski talog | FRAP ( $\mu\text{M TE}$ ) | ORAC ( $\mu\text{M TE}$ ) | DPPH (% inhibicije) |
|--------------|---------------------------|---------------------------|---------------------|
| Crno vino    | 8246 $\pm$ 817            | 25,3 $\pm$ 1,2            | 76,4 $\pm$ 5,5      |
| Rosé vino    | 3552 $\pm$ 439            | 15,0 $\pm$ 2,8            | 85,0 $\pm$ 0,9      |

Iz tablice 4. je vidljivo da testirani uzorci pokazuju izuzetno dobra antioksidacijska svojstva određena korištenjem svih metoda. Vrijednosti FRAP-a, odnosno redukcijaska sposobnost taloga crnog vina bila je 2,3 puta veća u usporedbi sa talogom rosé vina. Rezultati dobiveni DPPH metodom ukazuju na nešto bolji antioksidacijski kapacitet taloga rosé vina, dok rezultati dobiveni ORAC metodom ponovno idu u prilog talogu crnog vina koji je imao 1,3 puta veću aktivnost od taloga rosé vina.

Istraživanja provedena od strane drugih autora ukazuju također na dobar antioksidacijski potencijal ovih nusproizvoda vinifikacije. Tako npr. istraživanjima koja su proveli Romero-Diez i sur. (2018) na talogu crnog vina sorte *Tempranilo* ukazuju na široki raspon antioksidacijske aktivnosti testiranih uzoraka FRAP metodom koje su varirale između 362 i 2,2  $\mu\text{mol TE/g}$  suhe tvari. (26)

Dujmić i sur. (2020) su proveli istraživanja na talozima od dvije vrste crnoga vina, *Merlot* uzgajan u Istri i *Vranac* uzgojen u Mostaru. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti iznosile su 42,52 i 50,39 mg TE/g suhe tvari. (37)

U istraživanjima Ciliberti i sur. (2022) vrijednosti FRAP-a za ekstrakte taloga rosé vina sorte *Pinot Noir* iznosile su 179,2  $\mu\text{mol TE/g}$  suhe tvari (ekstrakcija provedena s etanolom i  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), i 294,56  $\mu\text{mol TE/g}$  suhe tvari (ekstrakcija provedena s vodom i  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). (30)

Istraživanje koje su proveli Zhijing i sur. (2018) pokazuje veću antioksidacijski kapacitet ekstrakata taloga crnih vina u usporedbi s ekstraktima taloga rosé vina. Za postizanje redukcije DPPH radikala od 50% unutar 10 minuta bilo je potrebno 3,75 mg taloga *Pinot Noire* rosé vina, a za isti učinak bilo je potrebno 0,938 mg taloga crnog vina. Autori su također u svom istraživanju došli do zaključka da su rezultati dobiveni ORAC metodom u skladu s rezultatima dobivenim DPPH metodom te da je antioksidacijska aktivnost proporcionalna sadržaju ukupnih fenola. (34)

Vinski talog kao nusproizvod bogat fenolnim spojevima s dobrom antioksidacijskom aktivnošću, ima odličan potencijal za primjenu u prehrambenoj industriji, ali potrebna su detaljnija istraživanja kako bi se utvrdile i druge komponente s potencijalnim pozitivnim učincima. Komponente poput estera i kiselina koje su prisutne u talogu omogućavaju njegovu primjenu kao prirodnog konzervansa. Upravo navedeno ukazuje na potrebu za dodatnim istraživanjima kako bi se dokazala doprinos i pozitivna uloga ostalih komponenata taloga i opravdala njegova primjena u prehrambenoj industriji.

## 4. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobivenih rezultata i provedene rasprave možemo istaknuti slijedeće zaključke:

- Udio ukupnih fenola u uzorcima vinskog taloga crnog vina bio je dvostruko veći u odnosu na talog rosé vina.
- HPLC metodom utvrđeno je da je u najvećoj koncentraciji u oba uzorka prisutna *p*-hidroksi benzojeva kiselina čije su vrijednosti 89,2 mg/L u talogu crnog vina te 39,9 mg/L u talogu rosé vina.
- Potvrđena je prisutnost flavanola katehina, epikatehina i epigalokatehina čije su koncentracije veće u talogu crnog vina.
- Koncentracija flavonola kvercetina bila je 12 puta veća u talogu crnog vina u odnosu na talog rosé vina.
- Uzorak vinskog taloga crnog vina pokazao je izvrsnu redukcijsku sposobnost (FRAP metodom) i sposobnosti inhibiranja slobodnog peroksil radikala (ORAC metodom), dok je najbolji antioksidacijski kapacitet (DPPH metodom) pokazao talog rosé vina.
- Potrebna su dodatna istraživanja u svrhu dokazivanja i mogućnosti primjene vinskog taloga u prehrambenoj industriji.

## 5. LITERATURA

1. Činjenice o crnom vinu, Dostupno na: <https://svijetlidvori.hr/cinjenice-o-crnom-vinu/>  
Pristupljeno: 11.08.2022
2. Šafranjević M. Utjecaj skladištenja na kakvoću crnog vina Plavac mali. Diplomski rad, Sveučilište Josipa Juraja Strossmayera u Osijeku. Osijek. 2018.
3. Nemzer B, Kalita D, Yashin AY, Yashin YI. Chemical Composition and Polyphenolic Compounds of Red Wines: Their Antioxidant Activities and Effects on Human Health – A Review. Beverage. 2022;8,1; <https://doi.org/10.3390/beverages8010001>
4. Najpopularnija hrvatska crna vina, Dostupno na: <https://adrianysus.com/hr/meest-populaire-rode-wijnen-uit-kroatie/> Pristupljeno: 11.08.2022
5. Slika 1. Dostupno na: <https://www.nezavisne.com/zivot-stil/zdravlje/Dobra-strana-crnog-vina-U-zdravlje-za-zdravlje/383482> Preuzeto 14.8.2022 Pristupljeno: 11.08.2022
6. Tomas D, Kolovrat D. Priručnik za proizvodnju vina – za male proizvođače i hobiste. Federalni agromediterranski zavod Mostar, Mostar, BiH. 2011.
7. Jakobi I. Proizvodnja crnih vina. Diplomski rad, Sveučilište Josipa Juraja Strossmayera u Osijeku, Osijek. 2015.
8. Alpeza I. Temelji kemijskog sastava vina. Glasnik zaštite bilja. 2008;6,143-150.
9. Blesić M, Mijatović D, Radić G, Blesić S. Praktično vinogradarstvo i vinarstvo, Sveučilište u Sarajevu, 2013. Dostupno na: <https://www.researchgate.net/publication/312095847>
10. USDA National Nutrient Data Base, Dostupno na: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/173190/nutrients> i <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/171908/nutrients>
11. Sve o rosé vinima i kako se proizvode, Dostupno na: <https://vinogradinuic.com/blog/2021/03/26/sve-o-rose-vinima-i-kako-se-proizvode/>  
Pristupljeno: 12.08.2022
12. Rose vina – Vodič za razumijevanje vina, Dostupno na: <https://ovinu.info/vodic-za-razumijevanje-rose-vina/> Pristupljeno: 12.08.2022
13. Rose vina – Svijetli dvori, Dostupno na: <https://svijetlidvori.hr/rose-vina/>  
Pristupljeno: 11.08.2022

14. Slika 2. Dostupno na: <https://www.gourmetspirit.cz/top-rose-cr/> Preuzeto 14.8.2022
15. Puhalek N. Ružičasta (rose) vina. *Glasnik zaštite bilja*. 2010;4,114-115.
16. Pajović-Šćepanović R, Savković S, Raičević D, Popović T. Characteristics of the Montenegrin rose wine. *Agriculture and Forestry*. 2017;63(4),131-139.
17. Leborgne C, Lambert M, Ducasse M A, Meudec E, Verbaere A, Sommerer N, Boulet J C, Masson G, Mouret J R, Cheynier V. Elucidating the Color of Rose Wines Using Polyphenol-Targeted Metabolomics. *Molecules*. 2022;27,1359. <https://doi.org/10.3390/molecules27041359>
18. Wang J, Capone D L, Wilkinson K L, Jeffery D W. Chemical and sensory profiles of rosé wines from Australia. *Food Chemistry*. 2016;196,682-693. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.111>
19. De Beer D, Joubert E, Galderblom W C A, Manley M. Phenolic Compounds: A Review of Their Possible Role as In Vivo Antioxidants of Wine. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 2002;23(2),48-61
20. Baroi A M, Popitui M, Fierascu I, Sărdărescu I D, Fierascu R C. Grapevine Wastes: A Rich Source of Antioxidants and Other Biologically Active Compounds. *Antioxidants*. 2022;11,393; <https://doi.org/10.3390/antiox11020393>
21. Freidman M. Antibacterial, Antiviral and Antifungal Properties of Wines and Winery Byproducts in Relation to Their Flavanoid Content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. *J. Agric. Food Chem.* 2014;62,6025-6042; <https://doi.org/10.1021/jf501266s>
22. Arboleda Mejia JA, Ricci A, Figueiredo AS, Versari A, Cassano A, Parpinello G P, De Pinho MN. Recovery of Phenolic Compounds from Red Grape Pomace Extract through Nanofiltration Membranes. *Foods*. 2020;9,1649; <http://dx.doi.org/10.3390/foods9111649>
23. Vejarano R, Lujan-Corro M. Red Wine and Health: Approaches to Improve the Phenolic Content During Winemaking. *Front. Nut.* 2022;9:890066; <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.890066>
24. Maia M, Cavaco A R, Laureano G, Cunha J, Eiras-Dias J, Matos A R, Duarte B, Figueiredo A. More than Just Wine: The Nutritional Benefits of grapevine leaves. *Foods*. 2021;10,2251; <https://doi.org/10.3390/foods10102251>
25. Matos MS, Romero-Díez R, Álvarez A, Bronze MR, Rodríguez-Rojo S, Mato Rafael B, Cocero MJ, Matias AA. Polyphenol- Rich Extracts Obtained from Winemaking Waste

- Streams as Natural Ingredients with Cosmeceutical Potential. *Antioxidants*. 2019;8,355; <http://dx.doi.org/10.3390/antiox8090355>
26. Romero-Díez R, Rodríguez-Rojo S, Cocero MJ, Duarte CMM, Matias A A, Bronze MR, Phenolic characterization of aging wine lees: correlation with antioxidant activities. *Food Chem*. 2018;259:188-195.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.119>
27. Alarcón M, López-Viñas M, Pérez-Coello M D, Consuelo Díaz-Maroto M, Alañón M E, Soriano A. Effect of Wine Lees as Alternative Antioxidants on Physicochemical and Sensorial Composition of Deer Burgers Stored during Chilled Storage. *Antioxidants*. 2020;9,687; <https://doi.org/10.3390/antiox9080687>
28. Jara-Palacios M J. Wine Lees as a Source of Antioxidant Compounds. *Antioxidants*. 2019;8,45; <https://doi.org/10.3390/antiox8020045>
29. Galušić S. Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti. Završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Zagreb. 2020.
30. Ciliberti M G, Francavilla M, Albenzio M, Inghese C, Santillo A, Sevi A, Caroprese M. Green extraction of bioactive compounds from wine lees and their bio-response on immune modulation using in vitro sheep model. *J. Dairy Sci.* 2022;105:4335-4353.  
<https://doi.org/10.3168/jds.2021-21098>
31. Pregiban K. Metode mjerenja antioksidacijske aktivnosti. Završni rad, Sveučilište Josipa Juraja Strossmayera u Osijeku, Osijek. 2017.
32. Rastija V, Medić-Šarić M. Kromatografske metode analize polifenola u vinima. *Kem. Ind*. 2009;58(3):121-128.
33. Slika 7. Dostupno na: [https://www.researchgate.net/figure/Reaction-for-FRAP-assay-Figure-4-Structures-of-bathocuproine-and-neocuproine-used-in\\_fig4\\_7856041](https://www.researchgate.net/figure/Reaction-for-FRAP-assay-Figure-4-Structures-of-bathocuproine-and-neocuproine-used-in_fig4_7856041) Preuzeto 20.8.2022
34. Zhijing Y, Shavandi A, Harrison R, El-Din A, Bekhit A. Characterization of Phenolic Compounds in Wine Lees. *Antioxidants*. 2018;7,48; <http://dx.doi.org/10.3390/antiox7040048>
35. Landeka Jurčević I, Dora M, Guberović I, Petra 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. <https://doi.org/10.17113/ft.b.55.01.17.4894>

36. Giacobbo A, Dias B B, Onorevoli B, Bernardes A M, Norberta de Pinho M, Bastos Caramão E, Rodrigues E, Assis Jacques R. Wine lees from 1st and 2nd rackings: valuable by-products. *J Food Sci Technol.* 2019;56(3),1559-1566. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03665-1>

37. Dujmić F, Kovačević Ganić K, Ćurić D, Karlović S, Bosiljkov T, Ježek D, Vidrih R, Hribar J, Zlatić E, Prusina T, Khubber S, Barba F J, Brnčić M. Non-Thermal Ultrasonic Extraction of Polyphenolic Compounds from Red Wine Lees. *Foods.* 2020;9,472. <https://doi.org/10.3390/foods9040472>