Utjecaj ukljanjanja lišća na antioksidacijsku i antibakterijsku aktivnost ekstrakata pokožice grožđa sorti Frankovka i Merlot (Vitis vinifera L.)

Kopić, Marina

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:008837

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
ODJEL ZA BIOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer: znanstveni

Marina Kopić

UTJECAJ UKLANJANJA LIŠĆA NA ANTIOKSIDACIJSKU I ANTIBAKTERIJSKU AKTIVNOST EKSTRAKATA POKOŽICE GROŽĐA SORTI FRANKOVKA I MERLOT *(VITIS VINIFERA* L.*)*

Diplomski rad

OSIJEK, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku **Diplomski rad**
Odjel za biologiju
Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer: znanstveni

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

UTJECAJ UKLANJANJA LIŠĆA NA ANTIOKSIDACIJSKU I ANTIBAKTERIJSKU AKTIVNOST EKSTRAKATA POKOŽICE GROŽĐA SORTI FRANKOVKA I MERLOT *(VITIS VINIFERA* L.*)*

Marina Kopić

Rad je izrađen na: Odjelu za biologiju, Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku
Mentor: dr.sc. Valentina Pavić, doc.

Kratak sažetak diplomskog rada:

Uklanjanje lišća je standardna vinogradarska mjera s ciljem postizanja boljeg dozrijevanja grožđa, prozračnosti, osiguravanja bolje zaštite od bolesti poput sive plijesni te boljeg razvoja mladica, a može se provoditi u različitim terminima. Cilj ovog istraživanja je bio utvrditi kako različiti termini uklanjanja lišća utječu na antioksidacijsku te antibakterijsku aktivnost etanolnih ekstrakata pokožice grožđa (*Vitis vinifera* L.) sorte Frankovka i Merlot. Određena je ukupna koncentracija fenolnih spojeva, antioksidacijska aktivnost te antibakterijsko djelovanje na Gram-pozitivne i Gram-negativne humane patogene. Istraživanje je provedeno na tri tretmana u tri ponavljanja (kontrolni tretman – bez uklanjanja lišća, uklanjanje lišća neposredno po završetku cvatnje te uklanjanje lišća u periodu pojave šare). Pokazalo se da uklanjanje lišća značajno povećava koncentraciju ukupnih fenolnih spojeva, kao i antioksidacijsku aktivnost kod obje ispitivane sorte. Antibakterijska aktivnost je bila povećana kod ekstrakata sorte Frankovka, ali ne i kod sorte Merlot.

Ključne riječi: uklanjanje lišća, Frankovka, Merlot, antioksidacijska i antibakterijska aktivnost, fenoli
Datum obrane:

Broj stranica: 51
Broj slika: 18
Broj tablica: 2
Broj literaturnih navoda: 61
Broj priloga: -
Jezik izvornika: hrvatski

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. dr.sc. Irena Labak, doc., predsjednik
2. dr.sc. Valentina Pavić, doc., mentor i član
3. dr.sc. Ivna Štolfa Čamagajevac, doc., član
4. dr.sc. Sandra Ećimović, doc., zamjena člana

Rad je pohranjen u: u knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i u Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, u elektroničkom obliku te je objavljen na web stranici Odjela za biologiju.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek **MS thesis**
Department of Biology
Graduate university study programme in Biology

Scientific Area: Natural science
Scientific Field: Biology

EFFECTS OF DEFOLIATION ON ANTIOXIDATIVE AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF GRAPE SKIN EXTRACTS OF MERLOT AND BLAUFRÄNKISCH (*VITIS VINIFERA* L.)

Marina Kopić

Thesis performed at: Department of Biology, J. J. Strossmayer, University of Osijek, Croatia
Supervisor: PhD Valentina Pavić, Assistant Professor

Short abstract:

Defoliation is a standard vineyard method with aim to achieve better ripening of grapes, breathability, better protection from various diseases like grey mold and better development of shoots. Process of defoliation can be implemented in different terms. The purpose of this study was to determine the effect of different terms of defoliation on antioxidative and antibacterial activity of grape skin ethanol extracts of Blaufränkisch and Merlot (*Vitis vinifera* L.). Total concentration of phenolic compounds, antioxidative activity and antibacterial activity on Gramm-positive and Gramm-negative human pathogens have been determined. The study was conducted on three treatments and three repetitions (control treatment – no defoliation, defoliation immediately after pre-bloom and defoliation before the start of veraison phase). The results showed statistically significant enhancement of total phenolic compounds as well as antioxidative activity at both studied cultivars. Antibacterial activity was increased only in extracts of Blaufränkisch.

Key words: defoliation, Blaufränkisch, Merlot, antioxidative and antibacterial activity, phenols

Date of the thesis defence:

Number of pages: 51
Number of figures: 18
Number of tables: 2
Number of references: 61
Original in: Croatian

Reviewers:
1. Irena Labak, PhD, Assistant Professor, president
2. Valentina Pavić, PhD, Assistant Professor, supervisor and reviewer
3. Ivna Štolfa Čamagajevac, PhD, Assistant Professor, reviewer
4. Sandra Ećimović, PhD, Assistant Professor, substitute reviewer

Thesis deposited in: Library of Department of Biology, University of J.J. Strossmayer Osijek and in National university library in Zagreb in elektronic form. It is also disposable on the web site of Departmetnt of Biology, University of J.J. Strossmayer Osijek.

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Valentini Pavić na strpljenju i vođenju kroz provedeno istraživanje te na pruženim savjetima tijekom pisanja ovog diplomskog rada.
Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji na bezgraničnoj podršci tijekom studija.
Također se želim zahvaliti prijateljima i kolegama koji su bili uz mene od samog početka studija.

SADRŽAJ

1. Uvod ... 1
1.1. Vinova loza ... 1
1.1.1. Opće značajke sorti Frankovka i Merlot ... 3
1.1.2. Fenolni spojevi grožđa ... 4
1.2. Antioksidacijsko djelovanje ... 7
1.2.1. Oksidativni stres ... 7
1.2.2. Reaktivne kisikove jedinke ... 7
1.2.3. Antioksidansi ... 8
1.2.4. Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti ... 9
1.2.4.1. DPPH (2,2-Difenil-1-pokrilhidrazil) metoda ... 9
1.3. Antibakterijsko djelovanje ... 11
1.3.1. Opća svojstva bakterija ... 11
1.3.2. Građa bakterija ... 11
1.3.3. Gram – pozitivne bakterije ... 12
1.3.4. Gram – negativne bakterije ... 13
1.3.5. Metode određivanja antibakterijskog djelovanja ... 14
1.3.5.1. Metoda određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) ... 14
1.4. Cilj rada ... 15
2. Materijali i metode ... 16
2.1. Materijali ... 16
2.2. Metode ... 17
2.2.1. Priprema uzoraka ... 17
2.2.2. Određivanje koncentracije fenolnih spojeva ... 17
2.2.2.1. Folin – Ciocalteu metoda ... 17
2.2.3. Antioksidacijska aktivnost ... 18
2.2.3.1. DPPH metoda ... 18
2.2.4. Određivanje antibakterijskog djelovanja ... 19
2.2.4.1. Hranjiva podloga ... 19
2.2.4.2. Bakterijski organizmi ... 19
2.2.4.3. Određivanje gustoće bakterijske suspenzije ... 20
2.2.4.4. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) ... 20
2.3. Statistička obrada podataka ... 22
3. Rezultati ... 23
3.1. Utjecaj defolijacije na koncentraciju fenolnih spojeva ... 23
3.2. Utjecaj defolijacije na ukupnu antioksidacijsku aktivnost ... 26
3.2. Utjecaj defolijacije na antibakterijsko djelovanje ... 29

4. Rasprava 40
5. Zaključci 44
6. Literatura 45

1. Uvod

1.1. Vinova loza

Vinova loza (lat. *Vitis vinifera* L.) je višegodišnja biljka penjačica iz velike porodice lozica (*Vitaceae*) (Tablica 1.). Potječe s područja Bliskog Istoka odakle se proširila po cijelom svijetu. Ubraja se među najzastupljenije poljoprivredne kulture u svijetu, koja svojom proizvodnjom, ali i primjenom nadmašuje ostale. Neke od najznačajnijih sorti u kontinentalnom dijelu Hrvatske su: Graševina, Frankovka, Rajnski rizling, Chardonnay, Cabernet sauvignon, Zweigelt, Pinot crni, Pinot sivi, Sauvignon bijeli, Merlot, Rizvanac, Rutica crvena, Traminac crveni, Silvanac zeleni, Pinot bijeli i Cabernet franc. Podregija Slavonija pripada jednoj od ekonomski najvažnijih vinogradarskih podregija Hrvatske. Brežuljkasti ili niskobrdoviti reljef sa srednjom godišnjom temperaturom zraka od oko 10.5 °C omogućava razvoj navedenih sorti grožđa (Maletić i sur., 2008).

Kako bi se povećala kakvoća grožđa, sve je zastupljeniji proces defolijacije vinove loze. To je odavno poznat zahvat kojim se u tehnologiji vinogradarske proizvodnje uklanjaju listovi u zoni grozda u svrhu postizanja boljeg dozrijevanja grožđa i prozračnosti. Pored toga, pokazalo se da defolijacija pozitivno djeluje na ukupnost fizioloških procesa vinove loze te na dinamiku dozrijevanja mladica i nakupljanja rezervnih tvari u njima. Može se provoditi u različitim terminima, neposredno prije pojave šare ili u šari te u novije vrijeme neposredno pred početak cvatnje ili po završetku cvatnje. Prvo se uklanja lišće iz unutrašnjosti trsa i ono sa sjeverne strane, dok se lišće sa južne strane ostavlja kako bi se grozdovi zaštitili od izravnog sunčevog utjecaja. Uglavnom se skidaju po 3 – 4 donja lista, koja su najčešće i najstariji (Mirošević i Kontić, 2008). Istraživanja pokazuju da je ranija defolijacija pokazala veliki potencijal za uspješnu kontrolu zaraze mikroorganizmima, a defolijacija prije cvatnje dovodi do smanjenja zbijenosti grozda i smanjenog prinosa grožđa (Lemut i sur., 2011). Defolijacija je značajna i kao mjera kojom se može utjecati na prisutnost i intenzitet zaraze grožđa sivom plijesni (Kozina, 1999). Provedena su brojna istraživanja o utjecajima defolijacije na dozrijevanje i kakvoću grožđa. Prema Reynolds i sur. (1995) defolijacija utječe na dobivanje vina izraženije muškatne arome, odnosno vina su bogatija mirisnim komponentama. Pozitivan utjecaj defolijacije na fiziološke procese vinove loze utvrdio je i Hunter i sur. (1991), u obliku poboljšanja fotosintetske aktivnosti listova i metabolizma biljke. Pokazalo se i da defolijacija utječe na ubrzano nakupljanje šećera, povećanje pH vrijednosti mošta, smanjenje sadržaja ukupnih kiselina te sadržaj kalija u moštu (Bledsoe i sur., 1998). Prema Spayd i sur. (2002),

grozdovi sorte Merlot na kojima je provedena defolijacija, imali su veću količinu glikozida, ukupnih flavonola i antocijana, u usporedbi s nedefoliranim biljkama.
Uočeni su slučajevi gdje postupak defolijacije dovodi do smanjenja broja bobica po grozdu, a mogući razlog tome je smanjenje lisne mase i manjak ugljikohidrata u biljci pored niske razine dušika, koja se pojavljuje kao posljedica potisnute apsorpcije hranjivih minerala korijena biljke (Peña-Olmosand i Casierra-Posada, 2015.).

Vinova loza se ističe svojim brojnim pozitivnim djelovanjima na zdravlje čovjeka, uključujući antibakterijsko djelovanje i antioksidacijsku aktivnost. U grožđu je prisutna prilično visoka koncentracija fenolnih spojeva, koji su zapravo odgovorni za navedena pozitivna djelovanja na zdravlje. Osim toga, fenolni spojevi imaju i protuupalno djelovanje te se smatra da kontinuirani unos polifenola smanjuje rizik od obolijevanja od kroničnih bolesti (Pandey i Rizvi, 2009).

Navedena pozitivna djelovanja biljke značajno su povećala zanimanje znanstvenika za istraživanja raznih učinaka grožđa. Broj metoda za određivanje antibakterijskog djelovanja, antioksidacijske aktivnosti i koncentracije fenolnih spojeva u posljednje se vrijeme povećava, kao i broj objavljenih znanstvenih radova iz tog područja.

Tablica 1. Sistematika vinove loze

Sistematika	
Carstvo	Plantae
Koljeno	Magnoliophyta
Razred	Magnoliopsida
Red	Vitales
Porodica	Vitaceae
Rod	*Vitis*
Vrsta	*Vitis vinifera*

1.1.1. Opće značajke sorti Frankovka i Merlot

Frankovka je sorta grožđa podrijetlom iz središnje Europe, pa je većina država iz navedenog područja zapravo smatra i navodi kao autohtonu. U Hrvatskoj spada u jednu od vodećih crnih sorti, a u podregiji Slavonija se nalazi na površini od 208,58 ha. Frankovka je prepoznatljiva po svojoj bujnoj nadzemnoj masi. Zahtijeva visoku sumu temperatura, a dobro podnosi i nešto hladnija podneblja i niske temperature. Može podnijeti različite tipove tala, dok su najprikladniji južni, zaštićeni položaji s umjerenom klimom. Grozd je krupan, a masa mu varira od 200 do 400 g. Bobice su srednje krupne s debelom i tvrdom pokožicom (Slika 1.). Ova sorta daje vino rubin crvene boje, vrlo dobre kakvoće, s naglašenom kiselinom te izraženom voćnom aromom (Mirošević i sur., 2008). Grožđe ove sorte sadrži od 18 – 22 % šećera, a sadržaj ukupnih kiselina iznosi od 7 – 9 g/L (Bešlić, 2010).



Slika 1. Prikaz grozda sorte Frankovka (web 1)

Merlot je sorta grožđa koja je po raširenosti sadnje vinove loze druga u svijetu. Pripada plemenitim vinskim lozama. Potječe iz francuske pokrajine Bordeaux gdje se i najviše uzgaja, ali raširena je i u većini vinorodnih zemalja slične umjerene klime koje se bave proizvodnjom vina. Merlot traži svježa, topla tla, na suhim ocjeditim površinama. Prikladan je za područja s umjerenom klimom. Neke od karakteristika sorte su izuzetno visoka rodnost, otpornost na smrzavanje tijekom zime te otpornost na gotovo sva gljivična oboljenja. Grozd je sitan do srednje krupan, a masa varira u širokim rasponima od 40 do 150 g (Marinčić, 2015). Bobice grožđa su srednje veličine, nejednake i okruglaste s vrlo tankom pokožicom (Slika 2.). Sorta podnosi različite sustave uzgoja. Po kakvoći vino zaostaje za Cabernetima i Pinotom crnim, ali je ipak natprosječne vrijednosti (Osrečak, 2014). Što se tiče biokemijskih karakteristika sorte,

sadržaj šećera se kreće od 18 – 22 %, dok je sadržaj ukupnih kiselina iznosi od 5.5 – 7.5 g/L (Tratnik, 2016).



Slika 2. Prikaz grozda sorte Merlot (web 2)

1.1.2. Fenolni spojevi grožđa

Fenolni spojevi su skupina sekundarnih metabolita koji su jedni od najbrojnijih spojeva u biljnom svijetu. To je mnogobrojna skupina spojeva koja uključuje velik broj podgrupa spojeva, a svima je zajedničko svojstvo da su topljivi u vodi i staničnom soku. Glavne skupine fenolnih spojeva su: fenolne kiseline, flavonoidi i tanini, ali i lignani, kumarini, kinoni (Pietta, 2000). Osnovnu strukturu polifenola čini aromatski prsten sa šest ugljikovih atoma s jednom ili više hidroksilnih (-OH) skupina ili derivata ove osnove strukture. Upravo zbog hidroksilnih skupina i zbog nezasićenih dvostrukih veza osjetljivi su na oksidaciju, što ih čini dobrim antioksidansima (Rice-Evans i sur., 1997). Biosinteza svih fenolnih spojeva prisutnih u vinu ima jednak biosintetski put, što je i razlog sličnosti struktura. Sintetiziraju se putem šikiminske kiseline te acetatnim putem (Kennedy, 2008). Fenolni spojevi se uglavnom sintetiziraju iz cimetne kiseline, koja je nastala od fenilalanina djelovanjem L-feniloalanin amonij-liaze PAL, enzima grananja između primarnog (shikimat puta) i sekundarnog (feniopropanoid) metabolizma. Do sinteze dolazi pri raznim okolišnim utjecajima i stresnim uvjetima (kod infekcija, ozljeda, niskih temperatura ili uvjeta smanjenih nutrijenata te izloženosti toksičnosti teškim metalima). Svi flavonoidi (oko 3000) imaju jednak biosintetski put, zato su njihove strukture slične.

Tijekom razvijanja bobica raste koncentracija polifenolnih spojeva u grožđu. Nakupljanje tanina i hidroksicimetnih kiselina počinje već pri zametanju bobica i raste sve do pojave šare. S druge strane, nakupljanje antocijana započinje u šari i nastavlja se tijekom dozrijevanja grožđa, dok se u najkasnijim fazama razvoja može uočiti blago smanjenje njihove koncentracije (Kennedy i sur., 2002).

Spojevi poput fenola i polifenolnih spojeva su sveprisutni u biljkama i igraju važnu ulogu u otpornosti na gljivice i mikrobe. Osim toga, mnogi flavoni i flavanoni su pokazali aktivnost protiv gljivičnih patogena koji se obično pojavljuju tijekom skladištenja voća i povrća, odnosno *Aspergillus sp., Botrytis cinerea* i *Fusarium oxysporum*. Fungicidalna aktivnost niza stilbena i srodnih spojeva je ispitivana protiv nekoliko gljiva, uključujući i neke patogene, koji inficiraju grožđe tijekom skladištenja (Rousseaux i sur., 2014).

U posljednjem desetljeću prepoznata je njihova vrijednost, jer se u brojnim istraživanjima pokazalo da imaju pozitivne učinke na zdravlje čovjeka. Neka od pozitivnih djelovanja su sposobnost vezanja slobodnih radikala (antioksidacijska aktivnost) te inaktivacija određenih enzima zbog čega im se pripisuju antikancerogena, protuupalna, antimikrobna, antialergijska i brojna druga djelovanja (Valls i sur., 2009). Njihova primarna funkcija u biljkama je obrana od patogenih mikroorganizama, biljojeda i štetnih insekata.

Kod grožđa najveći udio fenolnih spojeva se nalazi u pokožici bobice. Polifenolni spojevi su izuzetno važni u proizvodnji crnih vina jer uvelike doprinose boji vina i karakterističnom oporom i gorkom okusu te su zapravo oni glavni nosioci različitosti između crnih i bijelih vina (Ribéreau-Gayon i sur., 2000). U tehnologiji vina ovi spojevi imaju vrlo važnu ulogu u organoleptičkim svojstvima, vitaminima, procesu dozrijevanja i starenju vina (Judež, 1981.) Pigmentacija crnih sorata grožda potječe od antocijana, kojih nema kod bijelih sorata grožđa. Bijele sorte su također znatno siromašnije fenolnim spojevima u usporedbi s crnim sortama grožđa (Jackson, 2008). Pokožice grožđa bogate su resveratrolom (3,5,4'-trihidroksi-stilben), supstancom polifenolnog karaktera kojem se pripisuje iznimno blagotvorno djelovanje na zdravlje srca i krvnih žila. Koncentracija resveratrola također je daleko viša kod crnih sorti grožđa u odnosu na bijele sorte. Resveratrol se pokazao kao izuzetno koristan za zdravlje ljudi. Kao prirodni polifenol, pokazuje širok spektar bioloških aktivnosti, kao što su antioksidacijska i antibakterijska aktivnost te sposobnost apsorbiranja slobodnih radikala, smanjuje rizik od kardiovaskularnih bolesti, a sprječava i proliferaciju raka (Melzoch i sur., 2001). Biosinteza fenolnih spojeva i njihove akumulacije tijekom dozrijevanja grožđa potaknuta je različitim

čimbenicima poput genotipa, klimatskih uvjeta i sl. Udio polifenolnih spojeva u grožđu i vinu ovisi o velikom broju čimbenika, kao što su sorta grožđa, ekološki uvjeti uzgoja, primijenjeni agrotehnički zahvati u vinogradu te tehnike vinifikacije (Downey i sur., 2006). Na zastupljenost polifenola utječe i defolijacija, kojom se postiže bolja osvijetljenost grozdova, što rezultira boljom kakvoćom grožđa (Hunter i sur., 1991). Polifenoli su uključeni u brojne fiziološke procese kod biljaka, kao što su sinteza lignina i pigmenata, omogućavaju obranu od mnogih mikroorganizama te imaju ulogu u razvoju biljke (Bhattacharya i sur., 2010). Osim kod biljaka, uključeni su i brojne procese kod ljudi. Prema provedenom istraživanju, fenoli iz grožđa sprječavaju aterosklerozu brojnim mehanizmima, uključujući inhibiciju oksidacije LDL-a (engl. *Low-density lipoprotein*), poboljšavaju djelovanje endotela, snižavaju krvni tlak, reduciraju upalna stanja te aktiviraju proteine koji sprječavaju senescenciju stanica (Dohadwala i Vita, 2009). Pored već spomenutih učinaka defolijacije, kao što su povećanje nakupljanja šećera u grožđu, povećana koncentracija antocijana i glikozida, pokazalo se da djelomična defolijacija ima tendenciju smanjenja TDN-a (6-trimetil-1,2-dihidronaftalin) u grožđu, moštu i vinu. TDN je spoj odgovoran za prepoznatljivi miris petrola kod vina Rajnskog rizlinga, koji nije poželjan niti cijenjen u posljednje vrijeme (Schüttler i sur., 2015).

Folin – Coicalteu je jedna od najčešće korištenih metoda u svrhu određivanja ukupne koncentracije fenolnih spojeva ispitivanih uzoraka. To je vrlo uobičajena, jednostavna metoda koja zahtjeva samo osnovnu opremu, a kojom se dobije veliki broj podataka i rezultata pogodnih za uspoređivanje s rezultatima dobivenim korištenjem drugih metoda. Obzirom na to da različiti fenolni spojevi različito reagiraju, rezultate je potrebno prikazati kao ukupni sadržaj fenola u ekvivalentu galne kiseline (mg_{GAE}/mL ekstrakta) (Singleton i sur., 1999) ili kao mg katehina/mL ekstrakta (Di Stefano i sur., 1989). Metoda se bazira na reakciji Folin – Ciocalteu (FC) reagensa (kompleks fosfomolibdenske – fosfovolframske kiseline) s reducirajućim reagensom (fenolni spoj). Dolazi do prijenosa elektrona s fenolnih spojeva na kompleks fosfomolibdenske – fosfovolframske kiseline u alkalnom mediju, prilikom čega nastaje plavo obojenje. Količina reduciranog Folin – Ciocalteu reagensa određuje se mjerenjem na spektrofotometru, na valnoj duljini od 700nm (Matić i sur., 2017).

1.2. Antioksidacijsko djelovanje

1.2.1. Oksidativni stres

Neravnoteža između udjela oksidanasa i antioksidanasa u tijelu, s većim udjelom oksidansa, vodi do potencijalnih oštećenja, odnosno stanja koje nazivamo oksidativnim stresom. Oksidansi nastaju kao uobičajeni produkti aerobnog metabolizma, ali njihova se koncentracija može značajno povećati i kao posljedica nekog patofiziološkog stanja. Drugim riječima, oksidativni stres je posljedica prekomjernog stvaranja slobodnih radikala putem oksidacijsko – redukcijskih procesa. Također, oksidansi sudjeluju u brojnim procesima koji su dio upala, starenja, karcinogeneze, djelovanja i toksičnosti droga te brojnih drugih bolesti (Sies, 1997). Starenjem organizma, oštećenja nastala oksidativnim djelovanjem postaju mnogobrojnija te se zapravo smatra kako je oksidativni stres jedan od glavnih faktora koji uzrokuju starenje organizma. Pokazalo se da prisutnost antioksidativnih enzima umanjuje štetu nastalu kao posljedica oksidativnog stresa te na taj način produljuje životni vijek. Također se pokazalo da smanjen unos kalorične hrane također pozitivno djeluje na oksidativni stres, odnosno smanjuje ga, što je direktno povezano za smanjivanjem količine oštećenja te produljivanjem životnog vijeka kod sisavaca (Sochal i Weindruch, 1996).

1.2.2. Reaktivne kisikove jedinke

Reaktivne kisikove jedinke (**R**eactive **O**xygen **S**pecies - ROS) nastaju tijekom oksidativnog metabolizma mitohondrija te kao rezultat staničnog odgovora na ksenobiotike, citokine ili prisutnost bakterija. To su vrlo male jedinke kao što su superoksidni anion $\bullet O_2^-$, hidroksilni radikal •OH, hidroperoksilni radikal $HO_2\bullet$ te peroksilni radikal LOO•, no uključuju i molekule kao što su vodikov peroksid (H_2O_2) i singletni kisik, ($^1O_2$). Superoksidni anion i hidroksilni radikal smatraju se najreaktivnijima, ali sve navedene ROS reagiraju s lipidima, DNA i proteinima te uzrokuju promjene koje u konačnici vode do nastanka oksidativnog stresa (Ray i sur., 2012). Pored reaktivnih kisikovih jedinki (ROS), postoje i reaktivne dušikove jedinke (RNS) kao što su peroksinitrit i dušični monoksid (Pisochi i Pop, 2015). RNS, slično kao i ROS, u stanicama pojedinih tkiva mogu uzrokovati strukturne i funkcionalne promjene. Slobodni radikali jesu vrlo nestabilne kemijske čestice koje u vanjskoj ljusci imaju nespareni elektron. Slobodni radikali nastaju homolitičkim cijepanjem kovalentne veze, pri čemu svaki elektron ostaje vezan u susjednom atomu. Zbog nesparenoga elektrona, slobodni su radikali vrlo

reaktivni. Stvaranje slobodnih radikala u uskoj je sprezi s aerobnim metabolizmom. Relativno male količine reaktivnih kisikovih jedinki trajno se proizvode u svim aerobnim organizmima.

Ranije se smatralo kako je glavna i jedina uloga ROS-a u stanicama i organizmu zapravo nanošenje štete, ali daljnja istraživanja su pokazala kako ROS ima nespornu važnost u mnogobrojnim procesima, primjerice u unutarstaničnoj signalizaciji, proliferaciji, apoptozi, te imunološkom odgovoru (Matés i sur., 1994). Aktivirane fagocitotičke stanice poput monocita, neutrofila, eozinofila i makrofaga, proizvode ROS kao dio mehanizma uništavanja mikroorganizama nakon fagocitoze (Curnutte i Babior, 1987), zatim biljke koriste ROS kao signalne molekule u procesima kao što su programirana smrt, odgovor na abiotički stres, obrana od patogena i sl. (Mittler, 2002).

1.2.3. Antioksidansi

Antioksidansi su spojevi koje možemo klasificirati kao enzimske ili neenzimske, primarne ili sekundarne, topive u vodi ili lipidima, endogene ili egzogene te prirodne ili sintetičke. Svima je zajednička sposobnost inhibiranja ili odgode oksidacije drugih molekula, odnosno sprječavanje pojave neravnoteže unutar bioloških sustava. Takvim djelovanjem antioksidansi sprječavaju nastanak brojnih kardiovaskularnih i degenerativnih bolesti, bolesti bubrega, dijabetesa ili raka (Pisoschi i Pop, 2015).

Primjeri enzimskih antioksidanasa su superoksid dismutaza (SOD), zatim katalaza te glutation i NADH peroksidaza. Vitamin C, tokoferol i glutation su neki od najznačajnijih neenzimskih antioksidanasa, od kojih sva tri navedena uklanjaju ROS. α – tokoferol, odnosno vitamin E je poznat kao jedan od najučinkovitijih antioksidanasa topivih u lipidima, dok se iz skupine antioksidanasa topivih u vodi ističe askorbinska kiselina, odnosno vitamin C (Krumova i Cosa, 2016). Spomenuti enzimi pripadaju i skupini endogenih antioksidanasa, kao i bilirubin, albumin, mokraćna kiselina i metalotioneini. Kada endogeni antioksidansi ne mogu osigurati dovoljnu zaštitu, povećava se potreba za egzogenim, među koje spadaju spomenuti vitamini E i C, zatim vitamin D i K_3, β – karoteni i flavonoidi (Pisoschi i Negulescu, 2011).

U posljednje se vrijeme velika pažnja pridaje djelovanju polifenola, prirodno prisutnih unutar voća i povrća, koji su sastavni dio svakodnevne prehrane. Pokazalo se kako polifenoli izuzetno uspješno uklanjaju ROS, ali jednako tako mogu interferirati s uobičajenim procesima u

organizmu te čak umanjiti postotak pojavljivanja određenih oboljenja kod ljudi. Obzirom na to, voće je postalo vrlo proučavano, kao prirodni izvor polifenola, odnosno vrlo učinkovitiih antioksidanasa s dodatnim antimikrobnim djelovanjem (Nirmala i Narendhirakannan, 2011). Bobičasto voće, osobito aronija, kao i grožđe imaju vrlo visok udio antioksidanasa, što znači da su vrlo jaki prirodni antioksidansi. Od nejestivih biljnih dijelova s visokim udjelom antioksidanasa ističu se kora vrbe, iglice smreke i kora bora, ali i neke medicinske biljke poput vrijeska i divljeg ružmarina. Pored navedenih biljaka, kora krumpira i cikle također imaju izrazitu antioksidacijsku aktivnost (Kähkönen i sur., 1999). Grožđe, kao jedno od najraširenije i najčešće konzumirane vrste voća, je pokazalo vrlo jako antioksidativno djelovanje. Redovan unos antioksidanasa iz grožđa pomaže u sprječavanju nastanka ROS-a te posljedično lipidne peroksidacije (Rathi i Rajput, 2014).

Djelovanje komercijalno dostupnih antioksidansa uglavnom se odnosi na hvatanje slobodnih radikala („scavengers“) ili keliranje metala. Takvim djelovanjem inhibiraju lipidnu peroksidaciju reducirajući peroksilne i alkoksilne radikale u stabilne spojeve (Alamed i sur., 2009). Lipidna peroksidacija je jedan od ključnih koraka u patogenezi brojnih ozbiljnih bolesti. U normalnim uvjetima u tijelu se odvija mali broj reakcija oksidacije lipida. Činjenica da je lipidna peroksidacija samoodrživi lanac reakcija, za čiju je aktivaciju potrebna oksidacija samo nekoliko molekula lipida, čini taj proces prilično opasnim, jer može doći do značajnog oštećenja tkiva. Proces lipidne peroksidacije povezan je i s progresijom bolesti poput ateroskleroze, astme, Parkinsonove bolesti, oštećenja bubrega i sl. (Mylonas i Kouretas, 1999).

1.2.4. Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti

Zbog sve većeg zanimanja za antioksidanse, njihove aktivnosti i izvore, razvijene su brojne metode u svrhu određivanja točne antioksidacijske aktivnosti pojedinih spojeva te ekstrakata voća i povrća (Pisoschi i Negulescu, 2011). Postoji veliki broj propisa prema kojima je moguće povesti istraživanja i odrediti antioksidacijsku aktivnost raznih spojeva i uzoraka.

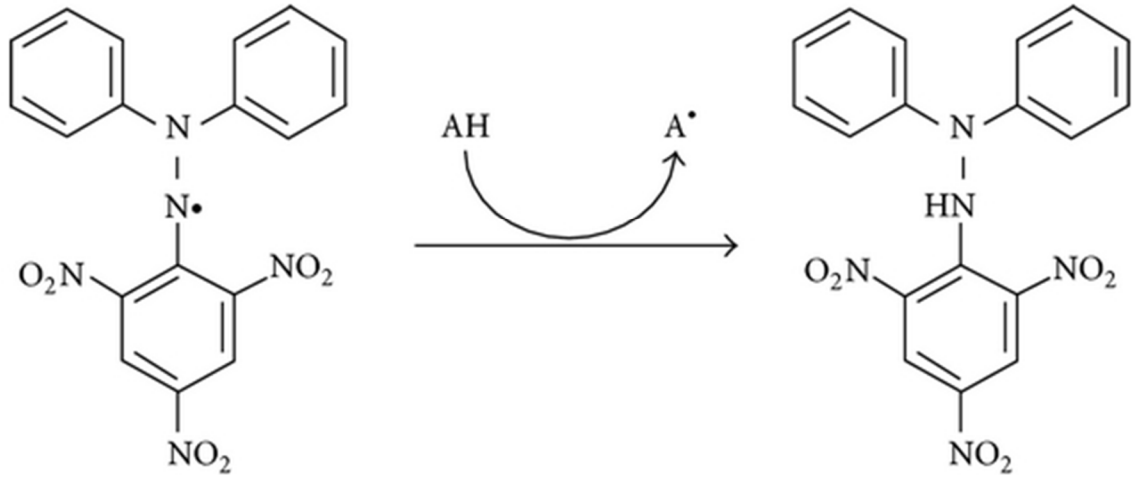
1.2.4.1. DPPH (2,2-Difenil-1-pokrilhidrazil) metoda

DPPH metoda je jednostavna i pogodna za određivanje antioksidacijske aktivnosti čistih spojeva, sokova voća i povrća ili ekstrakata (de Magalhães, 2007), kao i za određivanje antioksidacijske aktivnosti u namirnicama i biljnim proizvodima. Pored toga, upotrebljava se i

za određivanje stupnja lipidne peroksidacije, a zbog mogućnosti primjene za čvrste i tekuće uzorke vrlo je često korištena.

Ova se metoda temelji na redukciji stabilnog, tamnoljubičastog dušikovog radikala DPPH• koji zbog nesparenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu elektromagnetskog spektra, a maksimum apsorpcije je na 517 nm. Sparivanjem elektronskog para stabilnog radikala DPPH• u prisutnosti elektron donora (antioksidans koji hvata slobodne radikale), ljubičasta se boja mijenja u žutu. Nastali spoj ima smanjeni intenzitet apsorpcije u vidljivom dijelu spektra, a rezultirajuće obezbojenje u stehiometrijskom je odnosu s brojem sparenih elektrona. Drugim riječima, sposobnost hvatanja slobodnih radikala određuje se mjerenjem pada apsorbancije pri 515 - 528 nm (Molnar, 2011; Duane 2010). DPPH metoda je vrlo brza i točna metoda (Prakash i sur., 2001).

Molekula 2,2-difenil-pikrilhidrazila je stabilni radikal zbog delokalizacije slobodnog elektrona kroz molekulu, stoga molekule ne dimeriziraju kao što je to slučaj kod većine slobodnih radikala (Slika 3.).



DPPH (oks.) tamnoljubičasta boja DPPH (red.) žuta boja

Slika 3. Difenilpikrazil (slobodni radikal) i difenilpikrilhidrazin.

Delokalizacija elektrona kroz molekulu daje tamnoljubičastu boju koja se gubi dodatkom antioksidansa, kada iz slobodnog radikala, difenilpikrilhidrazila, nastaje reducirani oblik, svijetložuti difenilpikrilhidrazin (Molyneux, 2004; Gacche i sur., 2006).

Prvi put ovu su metodu objavili Brand-Williams i suradnici (1995). Rezultati se mogu izraziti na nekoliko načina. DPPH metoda je ovisna o otapalu i pH vrijednosti, a jedan od parametara koji određuju reakciju je i sterička dostupnost zato što male molekule, koje imaju bolji pristup radikalskom mjestu, pokazuju relativno visoku antioksidacijsku aktivnost (de Magalhães, 2007). Zapravo, to znači da reakcijski mehanizam između antioksidansa i DPPH• ovisi, između ostaloga, i o strukturi samog antioksidansa (Bondet i sur., 1997).

1.3. Antibakterijsko djelovanje

1.3.1. Opća svojstva bakterija

Bakterije pripadaju jednoj od najbrojnijih skupina organizama, među kojima je većina nužno potrebna za normalno funkcioniranje i održavanje ostalih mikroorganizama te imaju fundamentalnu ulogu u funkcioniranju Zemlje ostvarujući veliki utjecaj na biosferu.
Klasifikacija bakterija u određene skupine nije nimalo jednostavan zadatak. Brojna saznanja o biokemijskim i metaboličkim karakteristikama bakterija omogućila su zadovoljavajuću klasifikaciju bakterija. Raniji kriteriji za svrstavanje bakterija u određene skupine oslanjali su se na bojenje po Gramu te neke karakteristike kao što su pokretljivost bakterija, sposobnost stvaranja spora, sposobnost fotosintetiziranja te brojnost stanica. Obzirom na novija saznanja i otkrića moguće je svrstati bakterije u skupine obzirom na evolucijsku povezanost. Molekularne metode koje to omogućavaju su:

1) analiza sekvenci aminokiselina ključnih proteina,
2) analiza sekvenci nukleinskih kiselina određivanjem postotka guanina i citozina,
3) hibridizacija nukleinskih kiselina i
4) sekvencioniranje nukleinskih kiselina ribosomalne RNA (Raven, 2014).

1.3.2. Građa bakterija

Veličina i oblik bakterija vrsno su specifični. Što se tiče građe, neki od osnovnih dijelova su nukleoid, koji je ekvivalent jezgre, ribosomi, citoplazma i citoplazmatska membrana, dok je posebno građena stanična stijenka koja osigurava stalan oblik prisutna samo kod nekih vrsta. Prisutne su i vanjske dodatne strukture: kapsula, bičevi i dlačice (fimbriji ili pili). Spomenuta

stanična stijenka okružuje stanični protoplast tvoreći potporni skelet bakterijske stanice osiguravajući na taj način stalan oblik i zaštitu stanice od raznih negativnih djelovanja (Raven, 2014).

Obzirom na građu stanične stijenke, bakterije dijelimo na Gram – pozitivne i Gram – negativne bakterije. Metoda za utvrđivanje kojoj skupini bakterije pripadaju dobila je ime po istoimenom danskom biologu i liječniku, Hansu Christianu Joachimu Gramu. Bojanje bakterija vrši se pomoću kristalviolet boje, koja se fiksira Lugolovom otopinom, a potom se višak primarnog bojila ispire alkoholom. Gram – pozitivne bakterije zadržavaju plavo – ljubičastu boju primarnog bojila, dok Gram – negativne bakterije ne zadržavaju boju, nego se bojaju crveno. Takvo obojenje posljedica je različite građe stanične stijenke bakterija.

Gram – pozitivne bakterije imaju znatno deblji stol mureina – peptidoglikana (oko 90%), koji omogućava zadržavanje boje. Pored mureina sastavni dio stanične stijenke Gram – pozitivnih bakterija čine teikoična i lipoteikoična kiselina. Debljina stanične stijenke ovih bakterija iznosi oko 20 – 80 nm. Kod druge skupine, odnosno Gram – negativnih bakterija osim znatno tanjeg sloja peptidoglikana mureina (oko 12%), prisutni su još lipoproteini i fosfolipidi. Debljina stanične stijenke ovih bakterija iznosi oko 8 – 11 nm. Gram – negativne bakterije imaju i dodatnu vanjsku membranu izgrađenu od lipopolisaharida, koja ih čini rezistentnim na brojne antibiotike koji imaju sposobnost interferiranja sa staničnom stijenkom Gram – pozitivnih bakterija. Bojenje po Gramu je izuzetno važno za prepoznavanje pojedinih vrsta mikroorganizama sličnih po obliku, kao i za dijagnosticiranje određenih zaraznih bolesti (web 3).

1.3.3. Gram – pozitivne bakterije

Gram – pozitivne bakterije su generalno manje patogene od Gram – negativnih bakterija, iako se i među njima može naći nekolicina patogenih sojeva. Nepatogeni sojevi imaju brojne uloge u komercijalnoj upotrebi, kao što su proizvodnja sira te industrijska proizvodnja aminokiselina i enzima. *Staphylococcus aureus* i *Bacillus subtilis* samo su neke od vrsta koje pripadaju ovoj skupini patogena (Cho, 2017).

S. aureus je bakterija okruglog oblika, koja se u normalnim uvjetima nalazi u ljudskom organizmu, ali jednako tako je odgovorna za brojne infekcije i bolesti kod ljudi. Ova patogena

bakterija je rezistentna na antibiotike, što je znatno otežalo liječenje infekcija i bolesti uzrokovanih njome (Lowy, 1998.). *S. aureus* tvori brojne enzime i toksine koji mogu značajno utjecati na virulenciju pojedinih sojeva, a obično nastaju u hrani koja sadrži velike količine ugljikohidrata (kolači, sladoled, kreme) kada se namirnice drže u neprikladnim uvjetima, zbog čega je jedan od najčešćih uzroka trovanja hranom (Rauha i sur., 2000). Ubraja se među najotpornije nesporogene bakterije (Naglić i sur., 2005.),

B. subtilis se smatra najbolje proučenom Gram – pozitivnom bakterijom, korištenom kao modelni organizam za brojna istraživanja iz područja genetike i biokemije (Stein, 2005). To je štapićasta bakterija koja je vrlo čest onečišćivač materijala za bakteriološke podloge. Vrlo je proširen u okolišu. Često uzrokuje trovanja hranom kod ljudi (Naglić i sur., 2005).

1.3.4. Gram – negativne bakterije

Gram – negativne bakterije su zastupljenije od Gram – pozitivnih bakterija te je 90 – 95% ovih bakterija patogeno. Osim negativnog utjecaja na čovjeka, ove bakterije su također vrlo otporne na djelovanje antibiotika, što ih čini još opasnijima (Raven, 2014).
Pseudomonas aeruginosa i *Escherichia coli* samo su neke od vrsta koje pripadaju ovoj skupini patogena.

P. aeruginosa je štapićasta bakterija koja osim kod čovjeka može prouzrokovati razna oboljenja kako na biljkama, tako i na životinjama. Može preživjeti i kolonizirati i u anaerobnim uvjetima, što joj omogućava preživljavanje u gotovo svim dijelovima ljudskog organizma uzrokujući na taj način brojne upale i bolesti, koje u konačnici mogu dovesti i do smrti. Oportunistički patogen *P. aeruginosa* uzrokuje životno ugrožavajuće infekcije, uključujući upalu pluća i infekcije krvotoka. Ova Gram-negativna bakterija je glavni uzrok bolničkih infekcija posebno kod imunokompromitiranih pacijenata (Lyczak i sur., 2000.). Pokazalo se da *P. aeruginosa* ima sposobnost interferiranja s komponentama komplemenata uključenih u odgovor imunog sustava. Bakterija luči enzime koji razgrađuju određene komponente sustava komplemenata, ali isto tako može i vezati neke komponente te se na taj način obraniti od djelovanja imunog sustava (Kunert i sur., 2007).

Escherichia coli je također štapićasta bakterija, nešto manje patogena od *P. aeruginosa*. Uobičajene kolonije *E. coli* sastavni su dio normalne crijevne flore, koja čak može pozitivno

djelovati na samog domaćina. Postoje neki sojevi ove Gram – negativne bakterije koji su patogeni i mogu izazvati niz bolesti i infekcija, kao i *P. aeruginosa* (Kaper i sur., 2004). Također se pokazalo da *E. coli* rezistentna na antibiotike ima sposobnost prijenosa gena odgovornih za rezistenciju na druge vrste bakterija prisutnih u crijevima, kao što je recimo *Staphylococcus aureus*. Takvim horizontalnim prijenosom gena nastaju nove, na antibiotike rezistentni sojevi bakterija (Salyers i sur., 2004).

1.3.5. Metode određivanja antibakterijskog djelovanja

U posljednje vrijeme došlo je do značajnog porasta interesa u istraživanju i razvoju novih pripravaka s antibakterijskim djelovanjem. Upravo zbog toga je određivanje antibakterijskog djelovanja postalo popularna tema za brojna znanstvena istraživanja, a samim time porasla je potreba za novim, učinkovitim metodama određivanja antibakterijskog djelovanja. Neke od najčešće korištenih metoda su metoda minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i disk difuzijska metoda (Balouiri i sur., 2016).

1.3.5.1. Metoda određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC)

Minimalna inhibitorna koncentracija definirana je kao najniža koncentracija određene tvari, koja inhibira vidljivi rast mikroorganizama, odnosno bakterija, nakon inkubacije pri 37 °C u trajanju od 24 sata. Ova metoda koristi se u dijagnostičkim laboratorijima u svrhu potvrđivanja rezistencije, ali i kao metoda za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije u proučavanju *in vitro* aktivnosti novih spojeva ili ekstrakata (Andrews, 2001). Pripada skupini kvantitativnih metoda koje se baziraju na interakciji ispitivane supstance, čije se antibakterijsko djelovanje proučava, i mikroorganizma, odnosno bakterije (Van Vuuren, 2008).

1.4. Cilj rada

Cilj ovog diplomskog rada bio je utvrditi kako različiti termini ekološki prihvatljivog tretmana defolijacije utječu na ukupnu antioksidacijsku te antibakterijsku aktivnost etanolnih ekstrakata pokožice grožđa (*Vitis vinifera* L.) sorte Frankovka i Merlot određivanjem ukupne koncentracije fenolnih spojeva, ukupne antioksidacijske aktivnosti te antibakterijske aktivnosti na Gram-pozitivne i Gram-negativne humane patogene.

2. Materijali i metode

2.1. Materijali

Bobice grožđa obje sorte prikupljene su na području jednog od najpoznatijih kontinentalnih vinogorja Đakovo, na položaju Mandićevac. Vinograd je smješten na nadmorskoj visini od 208 m, a zauzima površinu od 1.42 ha. Demonstracijsko vinogradarsko – vinarsko pokušalište Mandićevac posađeno je tijekom 2013. godine, a obuhvaća najznačajnije preporučene sorte za proizvodnju bijelih (Chardonnay, Graševina, Rizling rajnski, Sauvignon bijeli, Traminac mirisavi) i crnih vina (Cabernet sauvignon, Merlot, Frankovka) (web 5). Lokacija je prikazana na Slici 4.



Slika 4. Prikaz demonstracijsko vinogradarsko – vinarskog pokušališta Mandićevac (web 5)

Vinogorje Đakovu se nalazi u području s umjereno kontinentalnom klimom, na prijelazu iz semiaridnog u semihumidni tip. Prosječna godišnja količina oborina iznosi 732.9 mm, što vinogorje Đakovo čini idealnim za uzgoj vinove loze, obzirom na to da optimalna godišnja količina oborina za uzgoj iznosi od 600 – 800 mm. Srednja godišnja temperatura ovog područja je 11.4 °C. Prilično velika variranja u temperaturama ne predstavljaju problem, osobito za uzgoj sorti Frankovke u Merlot, koje su izuzetno otporne na ekstremne temperature, kako niske tako i visoke.

2.2. Metode

Kemikalije korištene u eksperimentalnom dijelu ovog rada nabavljene su od komercijalnih dobavljača. Sva laboratorijska mjerenja napravljena su u Biokemijskom laboratoriju Odjela za biologiju u Osijeku.

Gustoća bakterijske suspenzije, kao i antioksidacijska aktivnost ekstrakata mjerene su na prijenosnom spektrofotometru (HACH DR/2010 Spectrophotometer).

Tijekom istraživanja u ekstraktima pokožica grožđa određeni su:

- Ukupni fenolni spojevi
- Ukupna antioksidacijska aktivnost
- Antibakterijska aktivnost.

2.2.1. Priprema uzoraka

Svaki uzorak predstavlja više nasumično odabranih grozdova s kojih se odvaja 10 bobica. S bobice se odvaja pokožica od pulpe. Pokožice su lagano osušene ubrusom kako ne bi došlo do gubitka antocijana. Nakon toga se važu i miješaju s 20 mL smjese C_2H_5OH: H_2O:HCl (70% etanol, 29% voda, 1% koncentrirana klorovodična kiselina, *w*=37%) u trajanju od 16 sati. Nakon filtracije analizirani su ukupni fenoli iz ekstrakta.

2.2.2. Određivanje koncentracije fenolnih spojeva

2.2.2.1. Folin – Ciocalteu metoda

Koncentracija fenolnih spojeva iz ekstrakata grožđa dviju sorti: Frankovka i Merlot određena je kvantitativnom Folin - Coicalteu metodom. U reakcijsku smjesu je dodano 0.5 mL razrjeđenog etanolnog ekstrakta grožđa Frankovke i Merlota (faktor razrjeđenja = 20), 2.5 mL destilirane vode i 0.5 mL Folin – Ciocalteu reagensa. Nakon toga, u periodu od najmanje 3, a najviše 5 minuta je dodano 2 mL 10 % -tne otopine Na_2CO_3. Reakcijska je smjesa dopunjena destiliranom vodom do 10 mL te je sve dobro promiješano. Pripremljene reakcijske smjese su inkubirane na sobnoj temperaturi u tamnom prostoru, u periodu od 90 minuta. Nakon toga je izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 700 nm. Svaki uzorak je pripremljen u tri paralelne probe. Na isti je način pripremljena i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta grožđa uzima destilirana voda (Di Stefano i sur., 1989).

Ukupni fenolni spojevi su izračunati su pomoću sljedeće formule kao mg katehina/L ispitivanog ekstrakta, a onda preračunati i izraženi kao mg katehina/g pokožice:

$$katehin\ \left(\frac{mg}{L}\right) = 186.5\ x\ E_{700}\ x\ d$$

gdje su:

186.5 – molarni ekstincijski koeficijent katehina

E_{700} – apsorbanca pri 700 nm

d – razrjeđenje ispitivanog ekstrakta.

2.2.3. Antioksidacijska aktivnost

2.2.3.1. DPPH metoda

Mjerenje ukupne antioksidacijske aktivnosti ekstrakata pokožice grožđa izvedeno je prema modificiranoj DPPH metodi, prema Shih i sur., 2007.

Postupak:

750 µL razrijeđene otopine ekstrakta pokožice grožđa i etanola (faktor razrijeđenja =1875) pomiješano je s 750 µL otopine DPPH radikala i etanola (0.2 mM), tako da je konačna koncentracija DPPH radikala bila 0.1 mM. Smjesa je dobro promiješana i inkubirana na sobnoj temperaturi 30 minuta. Nakon inkubacije izmjerena je apsorbancija pri λ = 517 nm. Kao kontrola korištena je 0.1 mM otopina DPPH radikala, a kao standard askorbinska kiselina. Sva mjerenja su provedena u tri paralele. Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala je izračunata prema sljedećoj formuli:

$$\%\ hvatanja\ DPPH\ radikala = \frac{Ab + As - Am}{Ab} \times 100$$

gdje su:

Ab – apsorbancija 0,1 mM etanolne otopine DPPH radikala pri λ = 517 nm;

As – apsorbancija 0,1 mM etanolne otopine ekstrakta pri λ = 517 nm (slijepa proba ekstrakta);

Am – apsorbancija 0,1 mM etanolne otopine smjese testiranih ekstrakata i DPPH radikala pri 517 nm.

2.2.4. Određivanje antibakterijskog djelovanja

2.2.4.1. Hranjiva podloga

U eksperimentu su bakterije nasađivane na čvrstu hranjivu podlogu Müller Hinton. To je neselektivna podloga na kojoj mogu rasti brojni mikroorganizmi.

Za pripremu 100 mL hranjive podloge potrebno je izvagati 2.2 g Müller Hintona, 0.5 g ekstrakta kvasca i 1.5 g agara. Zatim treba dodati 1 mL glicerola te do 100 mL 0,25M otopini PBS-a (fosfatnom puferu, engl. *phosphate buffer saline*) i s podešenom pH vrijednosti na 7,4. Potrebno je sve promiješati te kuhati 10 minuta. Zatim je potrebno podlogu autoklavirati na 121 °C tijekom 10 minuta. Nakon autoklaviranja, podlogu malo ohladiti i izliti u Petrijeve posude. Dodatnim hlađenjem podloga stvrdnjava te je tada moguće nasaditi bakterijske kulture. Podloge s nasađenim bakterijama inkubiraju se pri 37 °C u trajanju od 16 sati (Slika 5.). Čiste podloge, bez nasađenih bakterija se mogu čuvati u hladnjaku nekoliko mjeseci.

Tekuća hranjiva podloga korištena u mikrotitarskim pločicama je Müller Hinton bujon. Za pripremu 1 L bujona potrebno je izvagati 22 g Müller Hintona i dodati u 1 L destilirane vode, zatim zagrijati do potpunog otapanja te autoklavirati pri 121 °C tijekom 10 minuta. Pripremljenu tekuću podlogu ohladiti i koristiti.



Slika 5. Prikaz bakterijskih kultura nakon inkubacije

2.2.4.2. Bakterijski organizmi

Četiri korištene bakterije izolirane su iz različitih kliničkih uzoraka dobivenih s Mikrobiološkog odjela Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo u Osijeku. *Bacillus subtilis* i *Escherichia coli* odabrane su kao dva najčešće korištena modelna organizma u istraživanjima koja predstavljaju Gram – pozitivne i Gram – negativne bakterije. S druge strane, *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* odabrane su kao ljudski patogeni te također predstavljaju Gram –

pozitivne i Gram – negativne bakterije. Navedene bakterije su čuvane u hladnjaku, u dubokom agaru.

2.2.4.3. Određivanje gustoće bakterijske suspenzije

Gustoća bakterijskih suspenzija je određena prema McFarlandovom standardu, čiji je princip uspoređivanje sa suspenzijom poznatog zamućenja. Uporaba McFarland standarda je neophodna pri standardizaciji mikrobioloških metoda, a standardi su sukladni brojevima na McFarland skali (Tablica 2.). Pri određivanju minimalne inhibitorne koncentracije korišten je Standard 0.5, kod kojeg koncentracija bakterija iznosi 150 x 10^6/ml. Apsorbancija bakterijske suspenzije mjerena je u sterilnoj fiziološkoj otopini, pri λ = 600 nm.

Tablica 2. Vrijednost standarda na McFarland skali (McFarland J. 1907).

Standard	**Koncentracija bakterija[1] x10^6 /ml**	**Teoretska optička gustoća[2] pri 550 nm**	**Absorbancija pri 600nm**
0,5	150	0,125	0,063
1	300	0,25	0,123
2	600	0,50	0,242
3	900	0,75	0,431
4	1200	1,00	0,653
5	1500	1,25	0,867

[1] Koncentracija bakterija ovisi o njihovoj veličini, a brojevi prikazuju prosječnu vrijednost.

[2] Vrijednosti odgovaraju optičkoj gustoći bakterijske suspenzije.

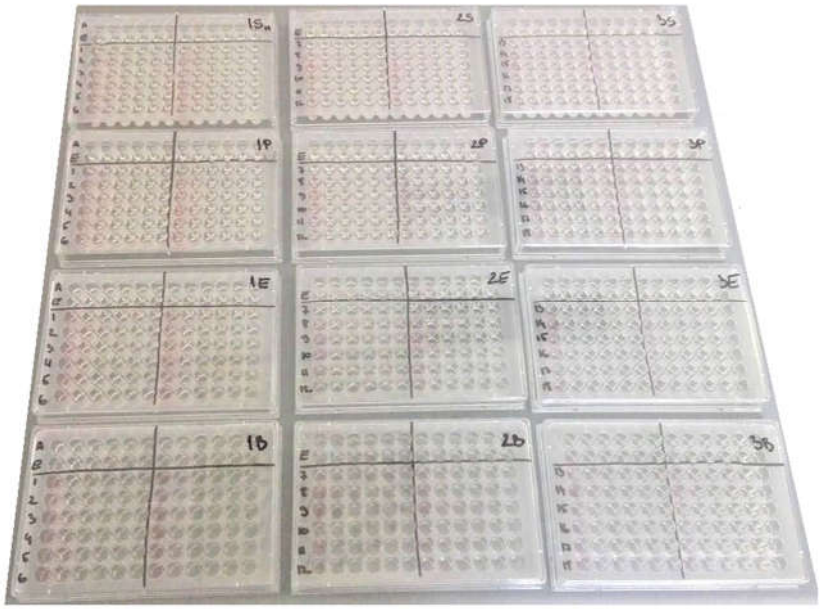
2.2.4.4. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC)

Pripremljena su 30 % -tna razrjeđenja svih ekstrakata. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije ekstrakata izvedeno je na mikrotitarskim pločicama s 96 jažica. U svaku je jažicu otpipetirano 100 µL Müller Hinton bujona. U prvu jažicu u nizu je dodano 100 µL antibiotika amikacina, koji je korišten kao pozitivna kontrola. Korišteni antibiotik je razrijeđen u omjeru 1:500. U drugu jažicu dodano je 100 µL otapala, odnosno etanola kao negativna kontrola. U svaku sljedeću jažicu u nizu dodano je po 100 µL razrijeđenih ekstrakata, redom od 1. do 18.

Multikanalnom pipetom je promiješano sve dodano u prve jažice u nizu te je nakon miješanja preneseno iz prvih jažica po 100 µL u sljedeće u svrhu dobivanja serijskih razrjeđenja. Sve je rađeno u duplikatu, tako da je na svakoj pločici nakon šeste jažice ponovljen postupak. Rezultati su preračunati prema određenom sadržaju katehina po mililitru ekstrakta te je antibakterijsko djelovanja ekstrakata izraženo u obliku mg katehina/mL ekstrakta.

Nakon razrjeđenja ispitivanih ekstrakata, u svaku jažicu je dodano 20 µL bakterijske suspenzije. Drugim riječima, u svaku je jažicu inokulirano 150 x 10^6 bakterija/mL, što je Standard 0.5 na McFarland skali. Tako pripremljene pločice stavljene su na inkubaciju na 37 °C tijekom 24 sata (Slika 6.).

Promjene nastale rastom, odnosno inhibicijom rasta bakterija očitavaju se golim okom. Naime, golim okom je vidljivo zamućenje u jažicama, što označava prisutnost bakterija u istima. Pojava zamućenja je dodatno uspoređivana s kontrolnim jažicama. Najveće razrjeđenje ekstrakata pri kojem nije došlo do pojave zamućenja predstavlja minimalnu inhibitornu koncentraciju pojedinog ekstrakta.



Slika 6. Prikaz mikrotitarskih pločica pripremljenih za inkubaciju

2.3. Statistička obrada podataka

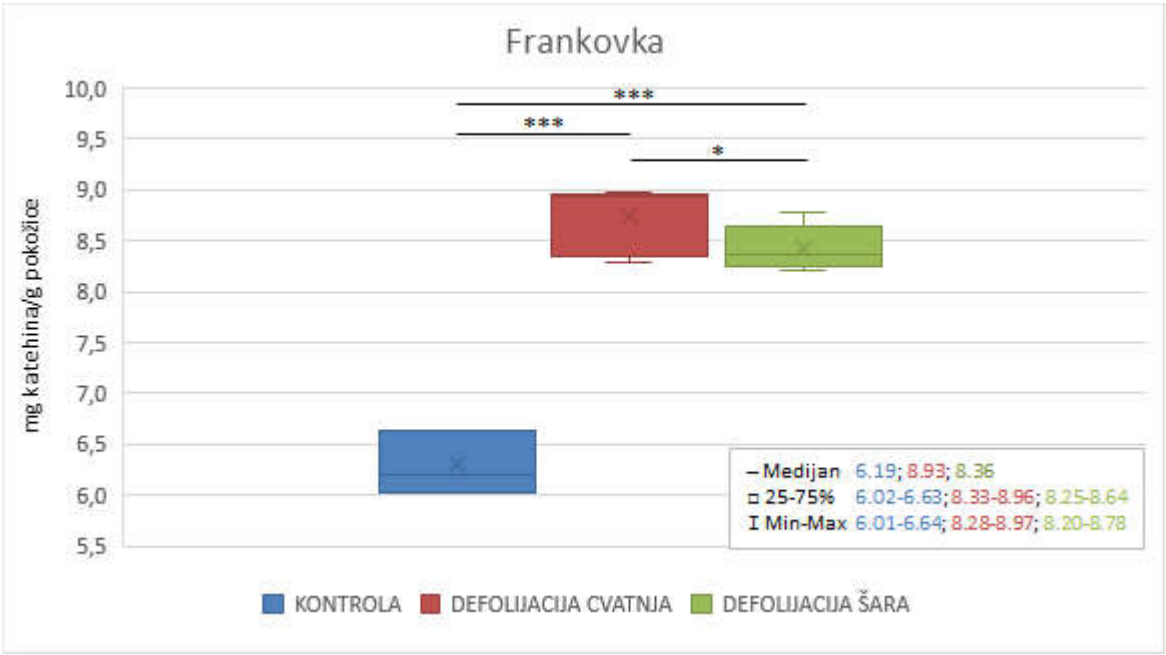
Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Shapiro-Wilk testom. Obzirom na to da podaci ne slijede normalnu raspodjelu, opisani su medijanom i granicama interkvartilnog raspona (podaci su prikazani grafovima vrste Box and Whisker plot). Navedeni graf se sastoji od pravokutnika koji prikazuje podatke od donjeg do gornjeg kvartila, crte po povratniku koja označava medijan te donje i gornje horizontalne linije koja se naziva Whisker, a predstavlja najmanji i najveći podatak. Znak „X“ unutar pravokutnika označava srednju vrijednost podataka. Za usporedbu kontrolne skupine s tretmanima defolijacije na koncentraciju ukupnih fenola, antioksidacijsku aktivnost i antibakterijsku aktivnost ekstrakata pokožice grožđa sorti Frankovka i Merlot korišten je neparametrijski Mann -Whitney U-test.

Podaci dobiveni ovim istraživanjem obrađeni su u statističkom programu STATISTICA 12.0 (Statsoft, Inc, Tulsa, OK, USA). Svi testovi provedeni su uz razinu značajnosti od $\alpha=0.05$.

3. Rezultati

Analizom rezultata uspoređen je utjecaj različitih termina defolijacije na koncentraciju ukupnih fenolnih spojeva (Slike 7. i 8.), ukupnu antioksidacijsku aktivnost (Slike 9. i 10.) i antibakterijsko djelovanje (Slike 11., 12., 13., 14., 15., 16., 17., i 18.) ekstrakata pokožice grožđa sorti Frankovke i Merlot.

3.1. Utjecaj defolijacije na koncentraciju fenolnih spojeva



Slika 7. Prikaz utjecaja defolijacije na koncentraciju ukupnih fenolnih spojeva u ekstraktima sorte Frankovka
*=p≤0.05; **=p≤0.01; ***=p≤0.001

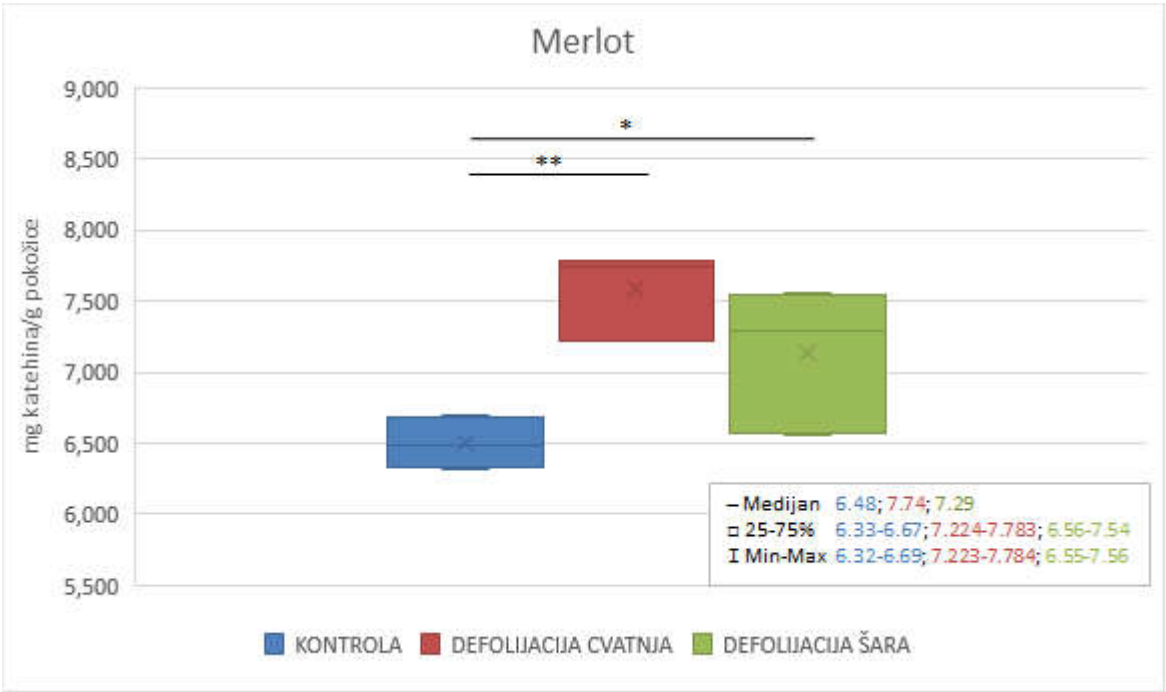
U tretmanu defolijacije u periodu cvatnje sorte Frankovka najniža koncentracija ukupnih fenolnih spojeva je iznosila 8.28 mg katehina/g pokožice, a najviša 8.97 mg katehina/g pokožice. Barem 50% ekstrakata ima 8.93 mg katehina /g pokožice ili manje te 8.93 mg katehina/g pokožice ili više. 25% ekstrakata ima 8.33 mg katehina/g pokožice ili manje, a 25% ekstrakata 8.96 mg katehina/g pokožice ili više. Srednja vrijednost koncentracija ukupnih fenolnih spojeva u provedenom tretmanu je 8.74 mg katehina/g pokožice.

Kod ekstrakata pokožice grožđa kod kojih je defolijacija provedena u periodu pojave šare najniža koncentracija ukupnih fenolnih spojeva je 8.20 mg katehina/g pokožice, dok je najviša koncentracija 8.78 mg katehina/g pokožice. Barem 50% ekstrakata ima 8.36 mg katehina/g

pokožice ili manje te 8.36 mg katehina/g pokožice ili više. 25% ekstrakata ima 8.25 mg katehina/g pokožice ili manje, a 25% ima 8.96 mg katehina/g pokožice ili više. Srednja vrijednost koncentracija ukupnih fenolnih spojeva u ovom tretmanu je 8.43 mg katehina/g pokožice.

Kod kontrolne skupina ekstrakata najniža koncentracija ukupnih fenolnih spojeva je iznosila 6.01 mg katehina/g pokožice, dok je najviša 6.64 mg katehina/g pokožice. Barem 50% ekstrakata ima 6.19 mg katehina/g pokožice ili manje te 6.19 mg katehina/g pokožice ili više. 25% ekstrakata ima 6.02 mg katehina/g pokožice ili manje, a 25% ekstrakta 6.63 mg katehina/g pokožice ili više. Srednja vrijednost koncentracija ukupnih fenolnih spojeva u kontrolnoj skupini je 6.29 mg katehina/g pokožice.

Prema tome, tretman defolijacije u periodu cvatnje doprinosi statistički značajno većim koncentracijama ukupnih fenolnih spojeva u odnosu na kontrolnu skupinu (U=0; N1=N2=9; p=0.0004). Defolijacija u periodu pojave šare je također rezultirala većom koncentracijom ukupnih fenolnih spojeva u odnosu na kontrolu (U=0; N1=N2=9; p=0.0004). Tretman defolijacije u periodu cvatnje rezultirao je statistički značajno većim koncentracijama ukupnih fenolnih spojeva u odnosu na defolijaciju u periodu pojave šare (U=0; N1=N2=9; p=0.04), što ukazuje na to da je za sortu Frankovka značajnija defolijacija u periodu cvatnje.



Slika 8. Prikaz utjecaja defolijacije na koncentraciju ukupnih fenolnih spojeva u ekstraktima sorte Merlot
**=p≤0.01; ***=p≤0.001

U tretmanu defolijacije u periodu cvatnje kod sorte Merlot najniža koncentracija ukupnih fenolnih spojeva je iznosila 7.223 mg katehina/g pokožice, a najviša 7.784 mg katehina/g pokožice. Barem 50% ekstrakata ima 7.74 mg katehina/g pokožice ili manje te 7.74 mg katehina/g pokožice ili više. 25% ekstrakata ima 7.224 mg katehina/g pokožice ili manje, a 25% ekstrakata 7.783 mg katehina/g pokožice ili više. Srednja vrijednost koncentracija ukupnih fenolnih spojeva u provedenom tretmanu je 7.58 mg katehina/g pokožice.

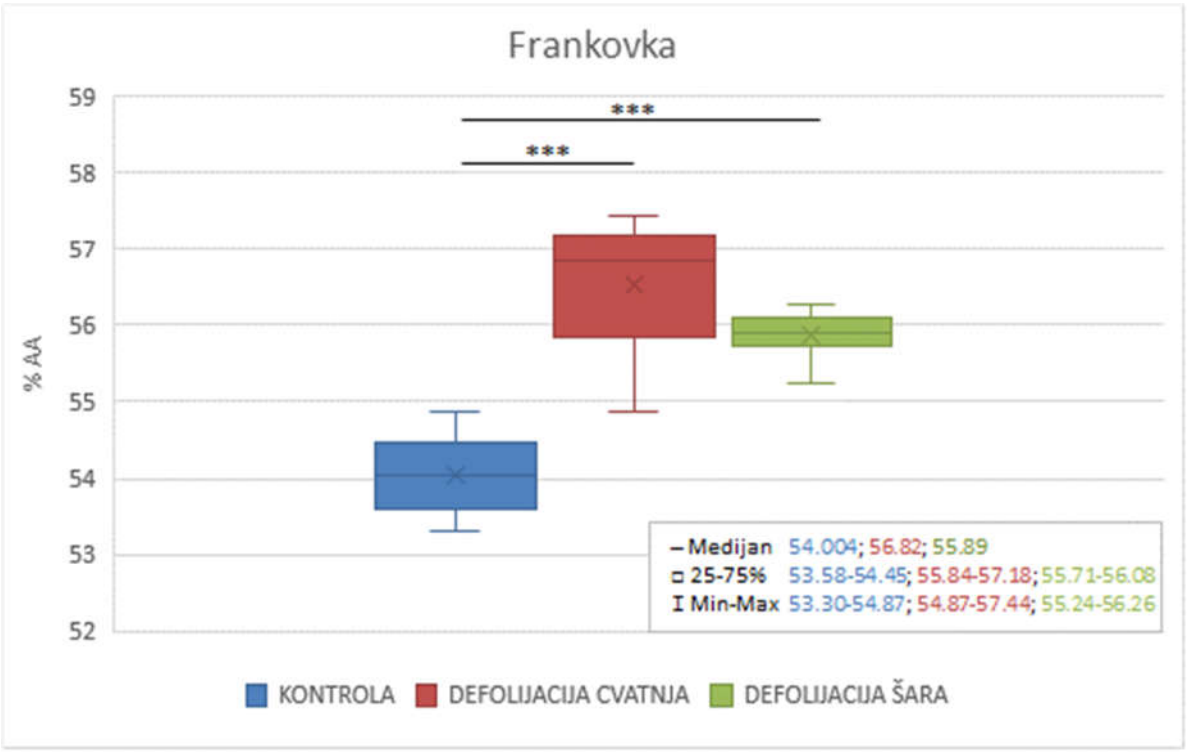
Kod ekstrakata pokožice grožđa kod kojih je defolijacija provedena u periodu pojave šare najniža koncentracija ukupnih fenolnih spojeva je 6.55 mg katehina/g pokožice, dok je najviša koncentracija 7.56 mg katehina/g pokožice. Barem 50% ekstrakata ima 7.29 mg katehina/g pokožice ili manje te 7.29 mg katehina/g pokožice ili više. 25% ekstrakata ima 6.56 mg katehina/g pokožice ili manje, a 25% ima 7.54 mg katehina/g pokožice ili više. Srednja vrijednost koncentracija ukupnih fenolnih spojeva u ovom tretmanu je 7.13 mg katehina/g pokožice.

Kod kontrolne skupina ekstrakata najniža koncentracija ukupnih fenolnih spojeva je iznosila 6.32 mg katehina/g pokožice, dok je najviša 6.69 mg katehina/g pokožice. Barem 50% ekstrakata ima 6.48 mg katehina/g pokožice ili manje te 6.48 mg katehina/g pokožice ili više. 25% ekstrakata ima 6.33 mg katehina/g pokožice ili manje, a 25% ekstrakta 6.67 mg katehina/g pokožice ili više. Srednja vrijednost koncentracija ukupnih fenolnih spojeva u kontrolnoj skupini je 6.50 mg katehina/g pokožice.

S obzirom na gore navedene rezultate, defolijacija u periodu cvatnje je pokazala statistički značajno veće koncentracije ukupnih fenolnih spojeva u odnosu na kontrolu (U=0; N1=N2=9; p=0.0004). Jednako tako, defolijacija u periodu pojave šare je pokazala statistički značajno veće koncentracije ukupnih fenolnih spojeva u odnosu na kontrolu (U=0; N1=N2=9; p=0.006). Defolijacija u periodu cvatnje je pokazala približno jednake rezultatima kao defolijacija u periodu pojave šare, što ukazuje na to da različiti termini defolijacije ne rezultiraju statistički značajnim razlikama kod sorte Merlot.

Usporedba tretmana defolijacije u periodu cvatnje dviju ispitivanih sorti je pokazala statistički značajno veće koncentracije ukupnih fenolnih spojeva kod sorte Frankovka, u odnosu na sortu Merlot (U=0; N1=N2=9; p=0.0004). Jednako tako, defolijacija u periodu pojave šare je pokazala statistički značajno veće koncentracije ukupnih fenolnih spojeva kod sorte Frankovka, u odnosu na sortu Merlot (U=0; N1=N2=9; p=0.0004). Kontrolne skupine dviju ispitivanih sorti se ne razlikuju značajno u koncentraciji ukupnih fenolnih spojeva.

3.2. Utjecaj defolijacije na ukupnu antioksidacijsku aktivnost



Slika 9. Prikaz utjecaja defolijacije na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata sorte Frankovka
***=p≤0.001; AA- % ukupne antioksidacijske aktivnosti

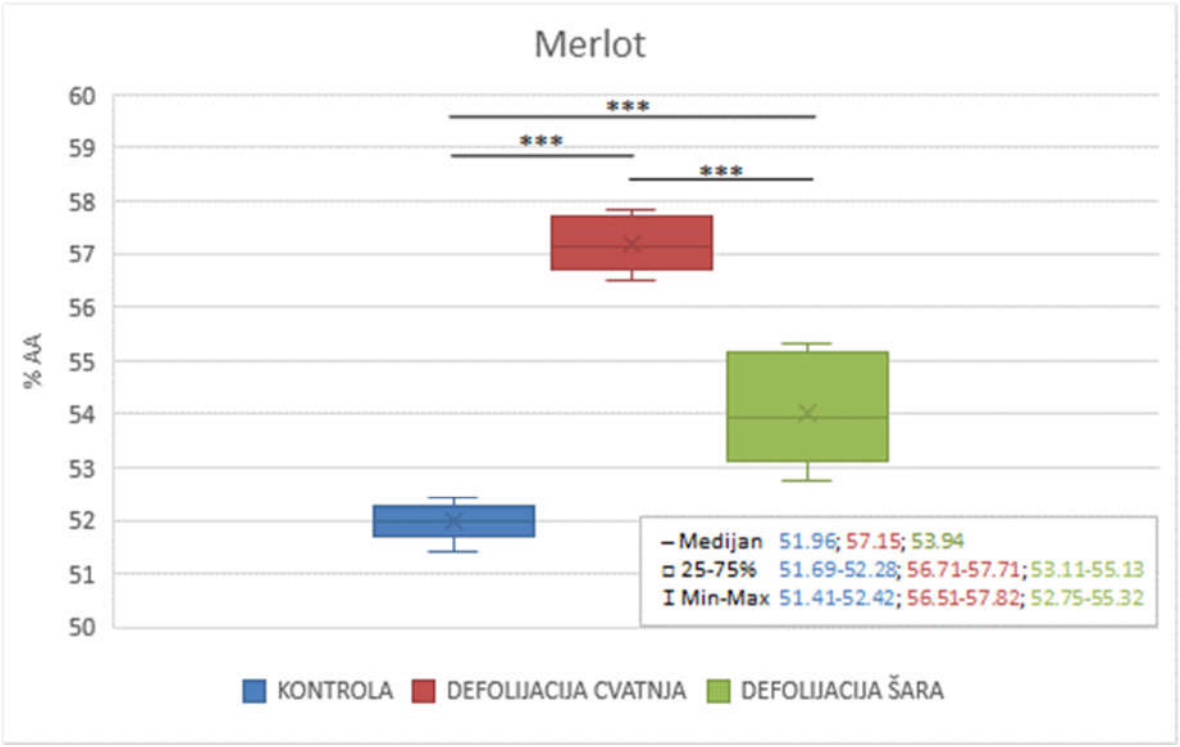
U tretmanu defolijacije u periodu cvatnje kod sorte Frankovka najmanji postotak antioksidacijske aktivnosti je iznosio 54.87%, a najveći 57.44%. Barem 50% ekstrakata ima antioksidacijsku aktivnost 56.82% ili manje te 56.82% ili više. 25% ekstrakata ima antioksidacijsku aktivnost 55.84% AA ili manje, a 25% ekstrakata antioksidacijsku aktivnost od 57,18% ili više. Srednja vrijednost antioksidacijske aktivnosti ekstrakata u provedenom tretmanu je 56.52%. Kao standard korištena je askorbinska kiselina koja je pokazala ukupnu antioksidacijsku aktivnost od 100.98%.

Kod ekstrakata pokožice grožđa kod kojih je defolijacija provedena u periodu pojave šare najmanja antioksidacijska aktivnost je iznosila 55.24%, dok je najveća iznosila 56.26%. Barem 50% ekstrakata ima antioksidacijsku aktivnost 55.89% ili manje te 55.89% ili više. 25% ekstrakata ima antioksidacijsku aktivnost 55.71% ili manje, a 25% ima antioksidacijsku aktivnost 56.08% ili više. Srednja vrijednost antioksidacijske aktivnosti ekstrakata u provedenom tretmanu je 55.86%.

Kod kontrolne skupine ekstrakata najmanji postotak antioksidacijske aktivnosti je iznosio 53.30%, dok je najveći iznosio 54.87%. Barem 50% ekstrakata ima antioksidacijsku aktivnost 54.004% ili manje te 54.004% ili više. 25% ekstrakata ima antioksidacijsku aktivnost 53.58%

ili manje, a 25% ekstrakta 54.45% ili više. Srednja vrijednost antioksidacijske aktivnosti ekstrakata u kontrolnoj skupini je 54.034%.

Prema tome, tretman defolijacije u periodu cvatnje pokazao je statistički značajno veću antioksidacijsku aktivnost u odnosu na kontrolnu skupinu (U=0; N1=N2=9; p=0.0004). Defolijacija u periodu pojave šare također je pokazala statistički značajno veću antioksidacijsku aktivnost u odnosu na kontrolnu skupinu (U=0; N1=N2=9; p=0.0004). Međusobna usporedba tretmana defolijacije je pokazali statistički približno jednake rezultate, što upućuje na to da za sortu Frankovka različiti termini defolijacije neće statistički značajno utjecati na povećanje ili smanjenje antioksidacijske aktivnosti.



Slika 10. Prikaz utjecaja defolijacije na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata sorte Merlot
***=p≤0.001; AA- % ukupne antioksidacijske aktivnosti

Kod tretmana defolijacije u periodu cvatnje kod sorte Merlot najmanja antioksidacijska aktivnost je iznosila 56.51%, a najveća 57.82%. Barem 50% ekstrakata ima antioksidacijsku aktivnost 57.15% ili manje te 57.15% ili više. 25% ekstrakata ima antioksidacijsku aktivnost 56.71% ili manje, a 25% ekstrakata 57,71% ili više. Srednja vrijednost antioksidacijske aktivnosti ekstrakata u provedenom tretmanu je 57.18%.

Kod ekstrakata pokožice grožđa kod kojih je defolijacija provedena u periodu pojave šare najmanja antioksidacijska aktivnost je iznosila 52.75%, dok je najveća iznosio 55.32%. Barem 50% ekstrakata ima antioksidacijsku aktivnost 53.94% ili manje te 53.94% ili više. 25%

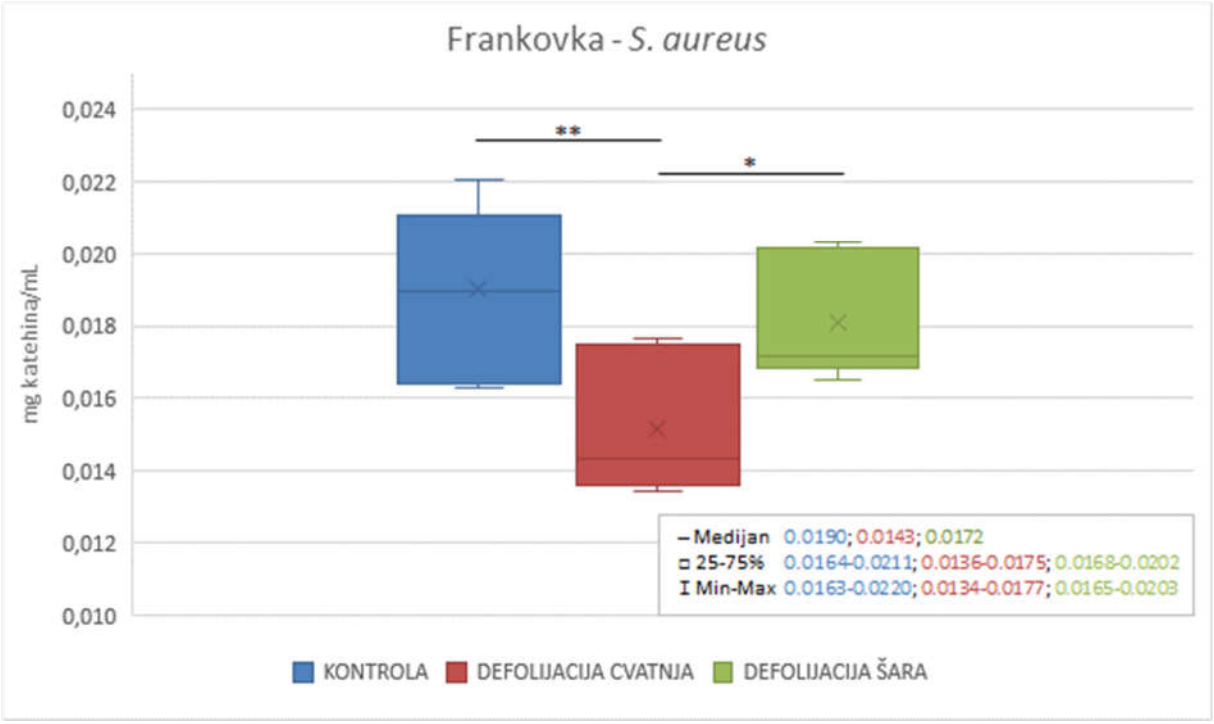
ekstrakata ima antioksidacijsku aktivnost 53.11% ili manje, a 25% ima 55.13% ili više. Srednja vrijednost antioksidacijske aktivnosti ekstrakata u provedenom tretmanu je 54.03%.

Kod kontrolne skupina ekstrakata najmanji postotak antioksidacijske aktivnosti je iznosio 51.41 %, dok je najveći iznosio 52.42%. Barem 50% ekstrakata ima antioksidacijsku aktivnost 51.96% ili manje te 51.96% ili više. 25% ekstrakata ima antioksidacijsku aktivnost 51.69% ili manje, a 25% ekstrakta 52.28% ili više. Srednja vrijednost antioksidacijske aktivnosti ekstrakata u kontrolnoj skupini je 51.96%.

Navedeni rezultati ukazuju na to da je tretman defolijacije u periodu cvatnje pokazao statistički značajno veću antioksidacijsku aktivnost u odnosu na kontrolnu skupinu (U=0; N1=N2=9; p=0.0004), kao i u odnosu na tretman defolijacije u periodu pojave šare (U=0; N1=N2=9; p=0.0004). Defolijacija u periodu pojave šare također je pokazala statistički značajno veću antioksidacijsku aktivnost u odnosu na kontrolnu skupinu (U=0; N1=N2=9; p=0.0004). Statistička analiza ukazuje na to da je antioksidacijska aktivnost ekstrakata sorte Merlot značajno najveća u slučaju defolijacije u periodu cvatnje.

Usporedba tretmana defolijacije u periodu cvatnje dviju ispitivanih sorti nije pokazala statistički značajne razlike antioksidacijske aktivnosti ekstrakata sorte Frankovka, u odnosu na sortu Merlot. S druge strane, defolijacija u periodu pojave šare je pokazala statistički značajno veću antioksidacijsku aktivnost sorte Frankovka, u odnosu na sortu Merlot (U=0; N1=N2=9; p=0.0007). Statistički značajne razlike zabilježene su i u usporedbi kontrolnih skupina dviju ispitivanih sorti. Esktrakti kontrolne skupine sorte Frankovka su pokazali značajno veću antioksidacijsku aktivnost u odnosu na ekstrakte sorte Merlot (U=0; N1=N2=9; p=0.0004).

3.2. Utjecaj defolijacije na antibakterijsko djelovanje



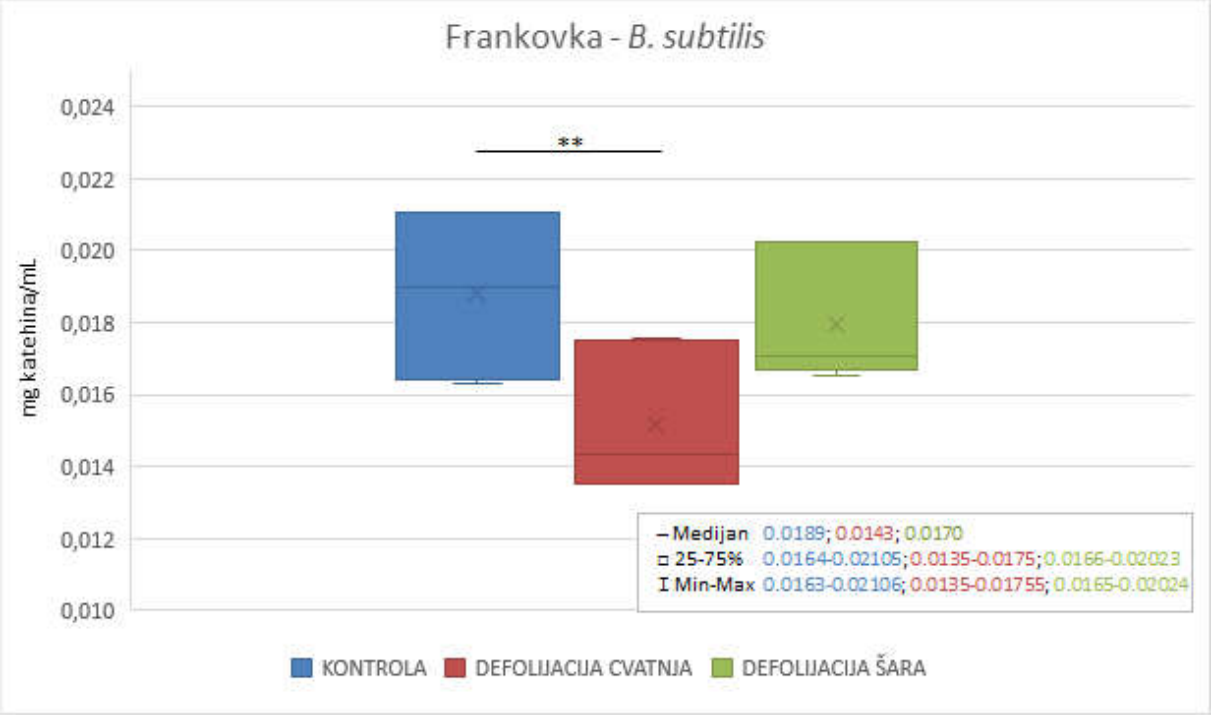
Slika 11. Prikaz utjecaja defolijacije na antibakterijsko djelovanje ekstrakata sorte Frankovka na Gram-pozitivnu bakteriju *S. aureus* *=p≤0.05; **=p≤0.01

Iz Slike 11. vidljivo je da je u tretmanu defolijacije u periodu cvatnje najniža minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) ekstrakata sorte Frankovka na bakteriju *S. aureus* iznosila 0.0134 mg katehina/mL ekstrakta, dok je najveća iznosila 0.0177 mg katehina/mL ekstrakta. Barem 50% ekstrakata ima 0.0143 mg katehina/mL ekstrakta ili manje te 0.0143 mg katehina/mL ekstrakta ili više. 25% ekstrakata ima 0.0136 mg katehina/mL ekstrakta ili manje, a 25% ekstrakata 0.0175 mg katehina/mL ekstrakta ili više. Srednja vrijednost minimalnih inhibitornih koncentracija u provedenom tretmanu je 0.0151 mg katehina/mL ekstrakta.

Kod tretmana defolijacije u periodu pojave šare najniža minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) je iznosila 0.0165 mg katehina/mL ekstrakta, a najveća je iznosila 0.0203 mg katehina/mL ekstrakta. Barem 50% ekstrakata ima 0.0172 mg katehina/mL ekstrakta ili manje te 0.0172 mg katehina/mL ekstrakta ili više. 25% ekstrakata ima 0.0168 mg katehina /mL ekstrakta ili manje, a 25% ekstrakata 0.0202 mg katehina/mL ekstrakta ili više. Srednja vrijednost minimalnih inhibitornih koncentracija u ovom je tretmanu 0.0181 mg katehina/mL ekstrakta.

U kontrolnoj skupini najniža minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) je iznosila 0.0163 mg katehina/mL ekstrakta, a najveća je iznosila 0.0220 mg katehina/mL ekstrakta. Barem 50% ekstrakata ima 0.0190 mg katehina/mL ekstrakta ili manje te 0.0190 mg katehina/mL ekstrakta ili više. 25% ekstrakata ima 0.0164 mg katehina/mL ekstrakta ili manje, a 25% ekstrakata 0.0211 mg katehina/mL ekstrakta ili više. Srednja vrijednost minimalnih inhibitornih koncentracija u ovom je tretmanu 0.0190 mg katehina/mL ekstrakta.

Prema tome, defolijacija u periodu cvatnje je rezultirala najboljim antibakterijskim djelovanjem, koje je statistički značajno različito u usporedbi s antibakterijskim djelovanjem tretmana defolijacije u periodu pojave šare (U=0; N1=N2=9; p=0.03), kao i u usporedbi s kontrolnom skupinom (U=0; N1=N2=9; p=0.006). Rezultati kontrolne skupine i tretmana defolijacije u periodu pojave šare se statistički ne razlikuju značajno.



Slika 12. Prikaz utjecaja defolijacije na antibakterijsko djelovanje ekstrakata sorte Frankovka na Gram-pozitivnu bakteriju *B. subtilis* **=p≤0.01

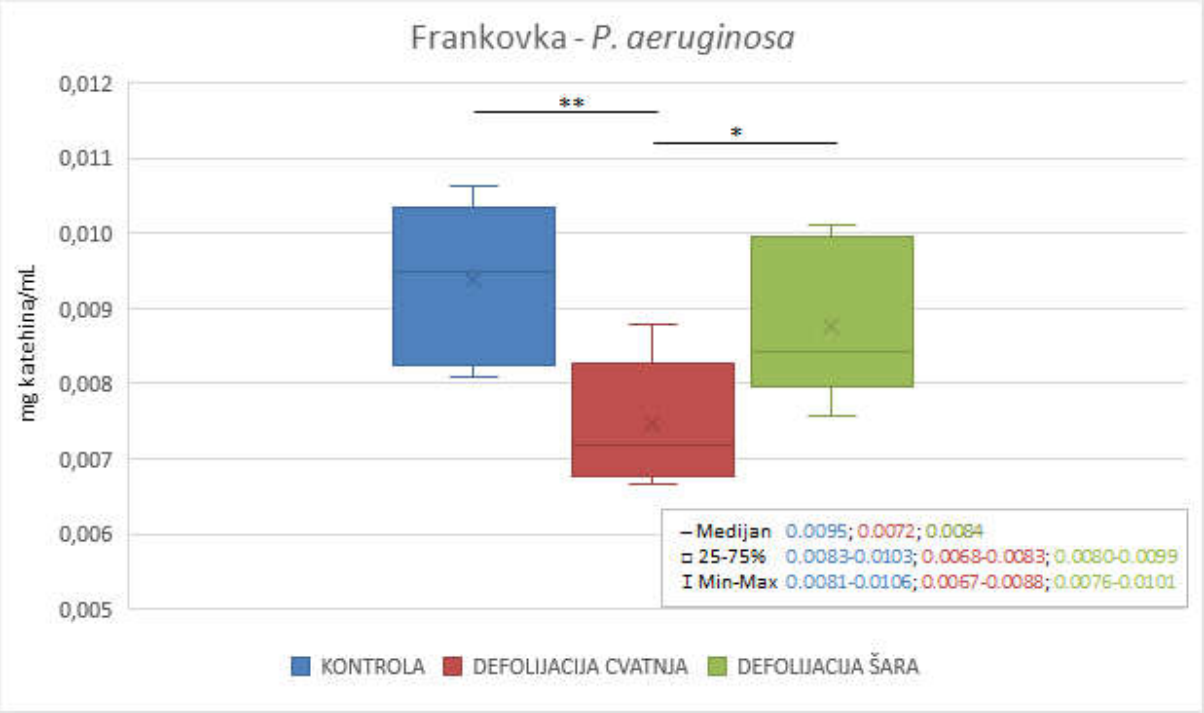
Kod tretmana defolijacije u periodu cvatnje najniža minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) ekstrakata sorte Frankovka na Gram-pozitivnu bakteriju *B. subtilis* je iznosila 0.0135 mg katehina/mL ekstrakta, dok je najveća iznosila 0.01755 mg katehina/mL ekstrakta. Barem 50% ekstrakata ima 0.0143 mg katehina/mL ekstrakta ili manje te 0.0143 mg katehina/mL ekstrakta ili više. 25% ekstrakata ima 0.0135 mg katehina/mL ekstrakta ili manje, a 25% ekstrakata

0.0175 mg katehina/mL ekstrakta ili više. Srednja vrijednost minimalnih inhibitornih koncentracija u provedenom tretmanu je 0.0151 mg katehina/mL ekstrakta.

U tretmanu defolijacije u periodu pojave šare najniža minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) je iznosila 0.0165 mg katehina/mL ekstrakta, a najveća je iznosila 0.02024 mg katehina/mL ekstrakta. Barem 50% ekstrakata ima 0.0170 mg katehina/mL ekstrakta ili manje te 0.0170 mg katehina/mL ekstrakta ili više. 25% ekstrakata ima 0.0166 mg katehina/mL ekstrakta ili manje, a 25% ekstrakata 0.02023 mg katehina/mL ekstrakta ili više. Srednja vrijednost minimalnih inhibitornih koncentracija u ovom je tretmanu 0.0179 mg katehina/mL ekstrakta.

U kontrolnoj skupini najniža minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) je iznosila 0.0163 mg katehina/mL ekstrakta, a najveća je iznosila 0.02106 mg katehina/mL ekstrakta. Barem 50% ekstrakata ima 0.0189 mg katehina/mL ekstrakta ili manje te 0.0189 mg katehina/mL ekstrakta ili više. 25% ekstrakata ima 0.0164 mg katehina/mL ekstrakta ili manje, a 25% ekstrakata 0.02105 mg katehina/mL ekstrakta ili više. Srednja vrijednost minimalnih inhibitornih koncentracija u ovom je tretmanu 0.0188 mg katehina/mL ekstrakta.

S obzirom na gore navedene rezultate, defolijacija u periodu cvatnje je rezultirala najboljim antibakterijskim djelovanjem, koje je statistički značajno različito u usporedbi s antibakterijskim djelovanjem kontrolne skupine ($U=0$; $N1=N2=9$; $p=0.006$). Rezultati defolijacije u periodu cvatnje i defolijacije u periodu pojave šare, kao i rezultati kontrolne skupine i tretmana defolijacije u periodu pojave šare se statistički ne razlikuju značajno.



Slika 13. Prikaz utjecaja defolijacije na antibakterijsko djelovanje ekstrakata sorte Frankovka na Gram-negativnu bakteriju *P. aeruginosa* *=p≤0.05; **=p≤0.01

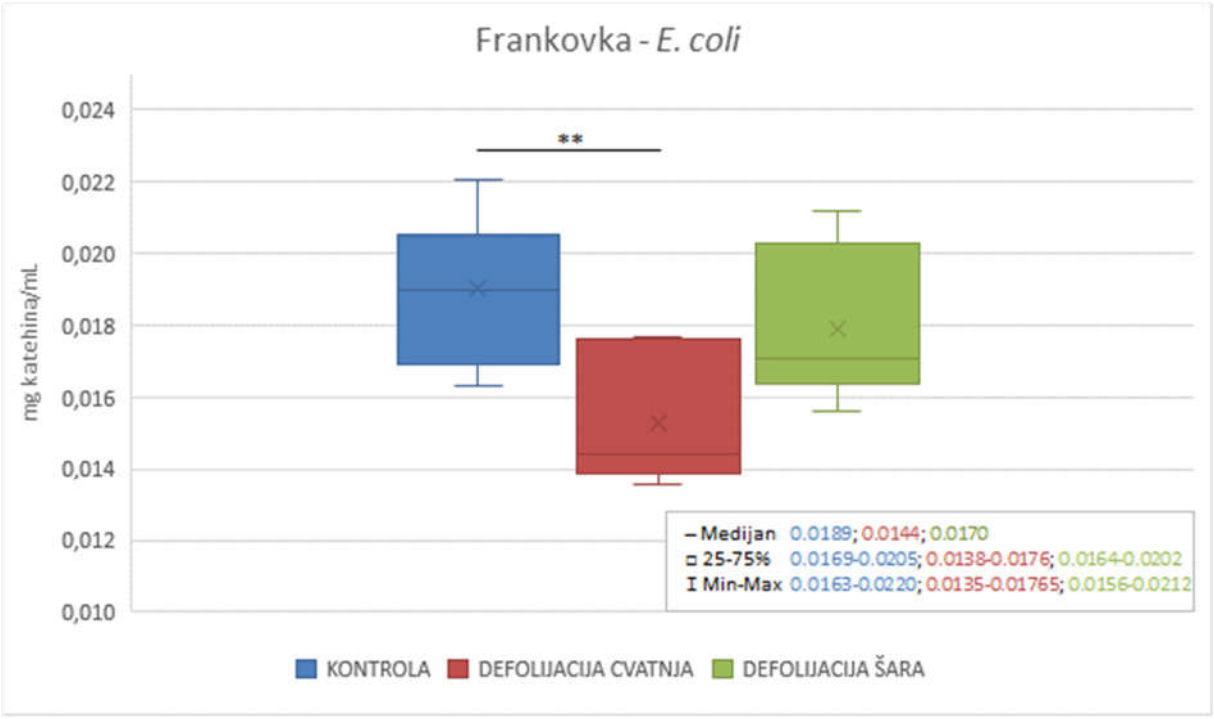
Iz Slike 13. se može vidjeti je da je u tretmanu defolijacije u periodu cvatnje najniža minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) ekstrakata sorte Frankovka na bakteriju *P. aeruginosa* iznosila 0.0067 mg katehina/mL ekstrakta, a najveća je iznosila 0.0088 mg katehina/mL ekstrakta. Barem 50% ekstrakata ima 0.0072 mg katehina/mL ekstrakta ili manje te 0.0072 mg katehina/mL ekstrakta ili više. 25% ekstrakata ima 0.0068 mg katehina/mL ekstrakta ili manje, a 25% ekstrakata 0.0083 mg katehina/mL ekstrakta ili više. Srednja vrijednost minimalnih inhibitornih koncentracija u provedenom tretmanu je 0.0075 mg katehina/mL ekstrakta.

U tretmanu defolijacije u periodu pojave šare najniža minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) je iznosila 0.0076 mg katehina/mL ekstrakta, a najveća je iznosila 0.0101 mg katehina/mL ekstrakta. Barem 50% ekstrakata ima 0.0084 mg katehina/mL ekstrakta ili manje te 0.0084 mg katehina/mL ekstrakta ili više. 25% ekstrakata ima 0.0080 mg katehina/mL ekstrakta ili manje, a 25% ekstrakata 0.0099 mg katehina/mL ekstrakta ili više. Srednja vrijednost minimalnih inhibitornih koncentracija u ovom je tretmanu 0.0087 mg katehina/mL ekstrakta.

U kontrolnoj skupini najniža minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) je iznosila 0.0081 mg katehina/mL ekstrakta, a najveća je iznosila 0.0106 mg katehina/mL ekstrakta. Barem 50% ekstrakata ima 0.0095 mg katehina/mL ekstrakta ili manje te 0.0095 mg katehina/mL ekstrakta ili više. 25% ekstrakata ima 0.0083 mg katehina/mL ekstrakta ili manje, a 25% ekstrakata

0.0103 mg katehina/mL ekstrakta ili više. Srednja vrijednost minimalnih inhibitornih koncentracija u ovom je tretmanu 0.0094 mg katehina/mL ekstrakta.

Prema tome, defolijacija u periodu cvatnje je rezultirala najboljim antibakterijskim djelovanjem, koje je statistički značajno različito u usporedbi s antibakterijskim djelovanjem tretmana defolijacije u periodu pojave šare (U=0; N1=N2=9; p=0.01), kao i u usporedbi s kontrolnom skupinom (U=0; N1=N2=9; p=0.002). Rezultati kontrolne skupine i tretmana defolijacije u periodu pojave šare se statistički ne razlikuju značajno.



Slika 14. Prikaz utjecaja defolijacije na antibakterijsko djelovanje ekstrakata sorte Frankovka na Gram-negativnu bakteriju *E. coli* **=p≤0.01

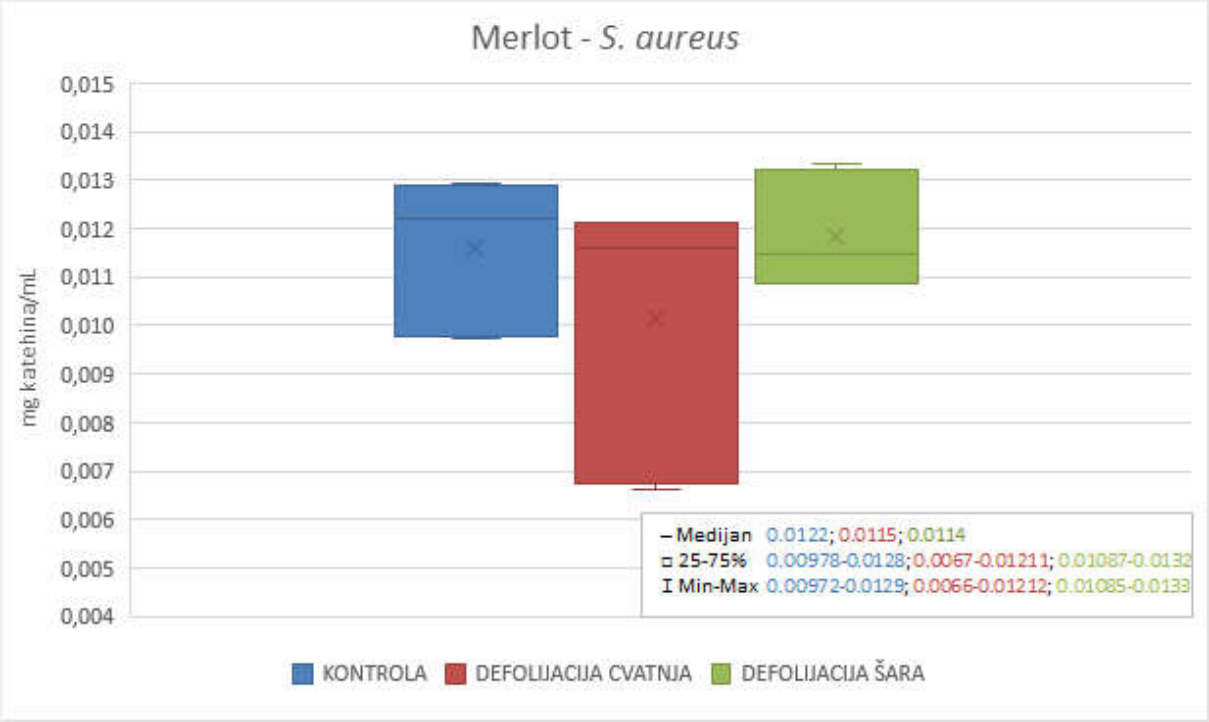
Kod tretmana defolijacije u periodu cvatnje najniža minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) ekstrakata sorte Frankovka na Gram-negativnu bakteriju *E. coli* je iznosila 0.0135 mg katehina/mL ekstrakta, dok je najveća iznosila 0.01765 mg katehina/mL ekstrakta. Barem 50% ekstrakata ima 0.0144 mg katehina/mL ekstrakta ili manje te 0.0144 mg katehina/mL ekstrakta ili više. 25% ekstrakata ima 0.0138 mg katehina/mL ekstrakta ili manje, a 25% ekstrakata 0.0176 mg katehina/mL ekstrakta ili više. Srednja vrijednost minimalnih inhibitornih koncentracija u provedenom tretmanu je 0.0152 mg katehina/mL ekstrakta.

Kod tretmanu defolijacije u periodu pojave šare najniža minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) je iznosila 0.0156 mg katehina/mL ekstrakta, a najveća je iznosila 0.0212 mg katehina/mL ekstrakta. Barem 50% ekstrakata ima 0.0170 mg katehina/mL ekstrakta ili manje

te 0.0170 mg katehina/mL ekstrakta ili više. 25% ekstrakata ima 0.0164 mg katehina/mL ekstrakta ili manje, a 25% ekstrakata 0.0202 mg katehina/mL ekstrakta ili više. Srednja vrijednost minimalnih inhibitornih koncentracija u ovom je tretmanu 0.0179 mg katehina/mL ekstrakta.

U kontrolnoj skupini najniža minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) je iznosila 0.0163 mg katehina/mL ekstrakta, a najveća je iznosila 0.0220 mg katehina/mL ekstrakta. Barem 50% ekstrakata ima 0.0189 mg katehina/mL ekstrakta ili manje te 0.0189 mg katehina/mL ekstrakta ili više. 25% ekstrakata ima 0.0169 mg katehina/mL ekstrakta ili manje, a 25% ekstrakata 0.0205 mg katehina/mL ekstrakta ili više. Srednja vrijednost minimalnih inhibitornih koncentracija u ovom je tretmanu 0.0190 mg katehina/mL ekstrakta.

Obzirom na gore navedene rezultate, defolijacija u periodu cvatnje je rezultirala najboljim antibakterijskim djelovanjem, koje je statistički značajno različito u usporedbi s antibakterijskim djelovanjem kontrolne skupine (U=0; N1=N2=9; p=0.006). Rezultati kontrolne skupine i tretmana defolijacije u periodu pojave šare te tretmana defolijacije u periodu cvatnje i defolijacije u periodu pojave šare se statistički ne razlikuju značajno.



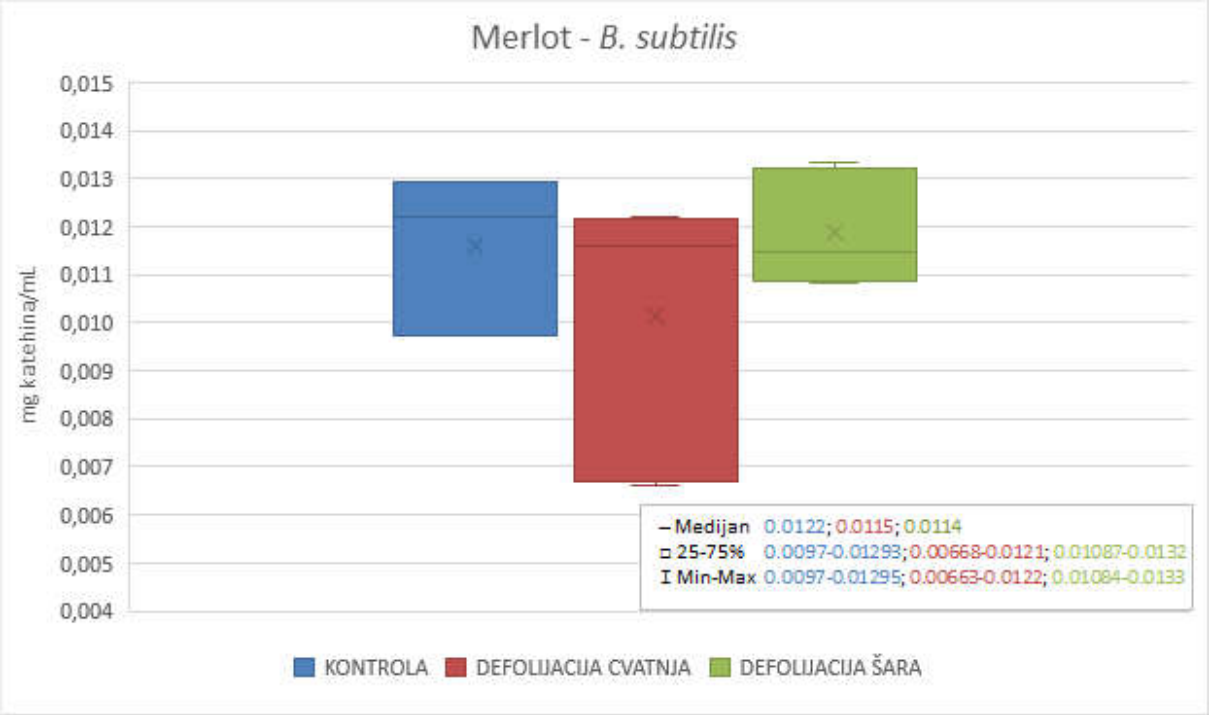
Slika 15. Prikaz utjecaja defolijacije na antibakterijsko djelovanje ekstrakata sorte Merlot na Gram-pozitivnu bakteriju *S. aureus*

Iz Slike 15. je vidljivo je da je u tretmanu defolijacije u periodu cvatnje najniža minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) ekstrakata sorte Merlot na bakteriju *S. aureus* iznosila 0.0066 mg katehina/mL ekstrakta, dok je najveća iznosila 0.01212 mg katehina/mL ekstrakta. Barem 50% ekstrakata ima 0.0115 mg katehina/mL ekstrakta ili manje te 0.0115 mg katehina/mL ekstrakta ili više. 25% ekstrakata ima 0.0067 mg katehina/mL ekstrakta ili manje, a 25% ekstrakata 0.01211 mg katehina/mL ekstrakta ili više. Srednja vrijednost minimalnih inhibitornih koncentracija u provedenom tretmanu je 0.0101 mg katehina/mL ekstrakta.

U tretmanu defolijacije u periodu pojave šare najniža minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) je iznosila 0.01085 mg katehina/mL ekstrakta, a najveća je iznosila 0.0133 mg katehina/mL ekstrakta. Barem 50% ekstrakata ima 0.0114 mg katehina/mL ekstrakta ili manje te 0.0114 mg katehina/mL ekstrakta ili više. 25% ekstrakata ima 0.01087 mg katehina/mL ekstrakta ili manje, a 25% ekstrakata 0.0132 mg katehina/mL ekstrakta ili više. Srednja vrijednost minimalnih inhibitornih koncentracija u ovom je tretmanu 0.0119 mg katehina/mL ekstrakta.

U kontrolnoj skupini najniža minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) je iznosila 0.00972 mg katehina/mL ekstrakta, a najveća je iznosila 0.0129 mg katehina/mL ekstrakta. Barem 50% ekstrakata ima 0.0122 mg katehina/mL ekstrakta ili manje te 0.0122 mg katehina/mL ekstrakta ili više. 25% ekstrakata ima 0.00978 mg katehina/mL ekstrakta ili manje, a 25% ekstrakata 0.0128 mg katehina/mL ekstrakta ili više. Srednja vrijednost minimalnih inhibitornih koncentracija u ovom je tretmanu 0.0116 mg katehina/mL ekstrakta.

Rezultati oba tretmana defolijacije, kao i kontrolne skupine su približno jednaki, te se statistički ne razlikuju značajno.



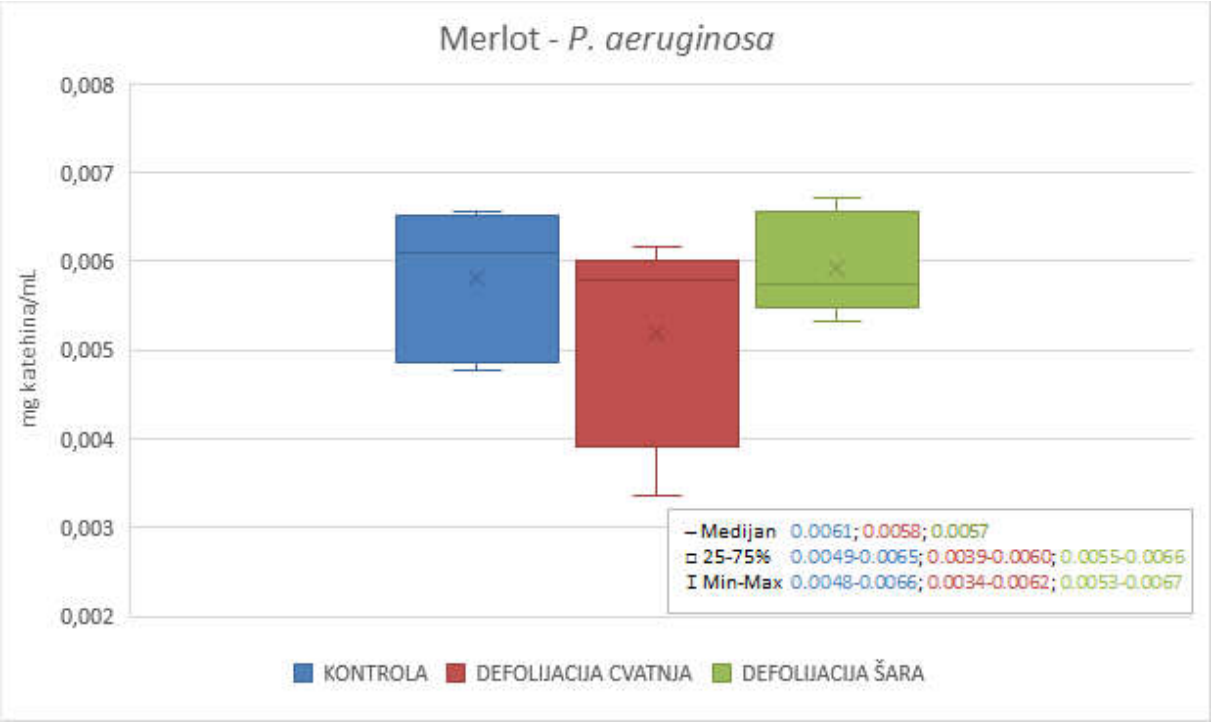
Slika 16. Prikaz utjecaja defolijacije na antibakterijsko djelovanje ekstrakata sorte Merlot na Gram-pozitivnu bakteriju *B. subtilis*

U tretmanu defolijacije u periodu cvatnje najniža minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) ekstrakata sorte Merlot na bakteriju *B. subtilis* je iznosila 0.00663 mg katehina/mL ekstrakta, a najveća je iznosila 0.0122 mg katehina/mL ekstrakta. Barem 50% ekstrakata ima 0.0115 mg katehina/mL ekstrakta ili manje te 0.0115 mg katehina/mL ekstrakta ili više. 25% ekstrakata ima 0.00668 mg katehina/mL ekstrakta ili manje, a 25% ekstrakata 0.0121 mg katehina/mL ekstrakta ili više. Srednja vrijednost minimalnih inhibitornih koncentracija u provedenom tretmanu je 0.0101 mg katehina/mL ekstrakta.

Kod tretmanu defolijacije u periodu pojave šare najniža minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) je iznosila 0.01084 mg katehina/mL ekstrakta, a najveća je iznosila 0.0133 mg katehina/mL ekstrakta. Barem 50% ekstrakata ima 0.0114 mg katehina/mL ekstrakta ili manje te 0.0114 mg katehina/mL ekstrakta ili više. 25% ekstrakata ima 0.01087 mg katehina/mL ekstrakta ili manje, a 25% ekstrakata 0.0132 mg katehina/mL ekstrakta ili više. Srednja vrijednost minimalnih inhibitornih koncentracija u ovom je tretmanu 0.0119 mg katehina/mL ekstrakta.

U kontrolnoj skupini najniža minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) je iznosila 0.00972 mg katehina/mL ekstrakta, a najveća je iznosila 0.01295 mg katehina/mL ekstrakta. Barem 50% ekstrakata ima 0.0122 mg katehina/mL ekstrakta ili manje te 0.0122 mg katehina/mL ekstrakta ili više. 25% ekstrakata ima 0.00978 mg katehina/mL ekstrakta ili manje, a 25%

ekstrakata 0.01293 mg katehina/mL ekstrakta ili više. Srednja vrijednost minimalnih inhibitornih koncentracija u ovom je tretmanu 0.0116 mg katehina/mL ekstrakta.
Rezultati oba tretmana defolijacije, kao i kontrolne skupine su približno jednaki, te se statistički ne razlikuju značajno.



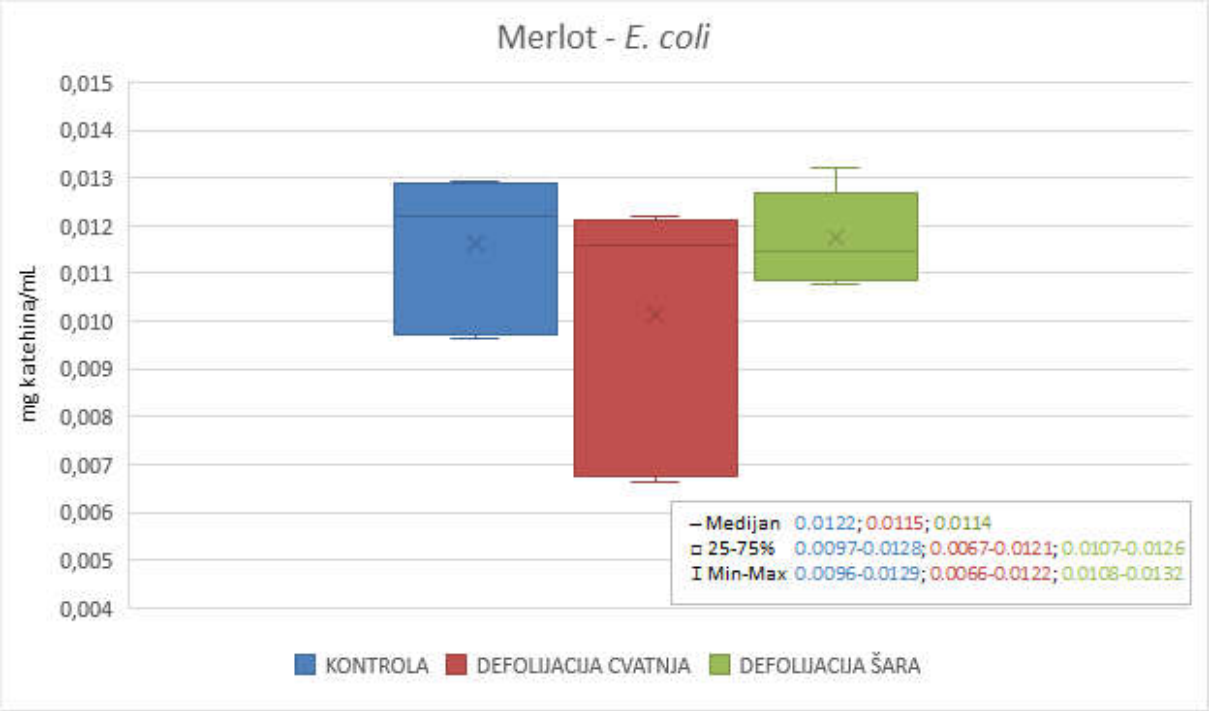
Slika 17. Prikaz utjecaja defolijacije na antibakterijsko djelovanje ekstrakata sorte Merlot na Gram-negativnu bakteriju *P. aeruginosa*

Iz Slike 17. se može vidjeti je da je u tretmanu defolijacije u periodu cvatnje najniža minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) ekstrakata sorte Merlot na Gram-negativnu bakteriju *P. aeruginosa* iznosila 0.0034 mg katehina/mL ekstrakta, dok je najveća iznosila 0.0062 mg katehina/mL ekstrakta. Barem 50% ekstrakata ima 0.0058 mg katehina/mL ekstrakta ili manje te 0.0058 mg katehina/mL ekstrakta ili više. 25% ekstrakata ima 0.0039 mg katehina/mL ekstrakta ili manje, a 25% ekstrakata 0.0060 mg katehina/mL ekstrakta ili više. Srednja vrijednost minimalnih inhibitornih koncentracija u provedenom tretmanu je 0.0052 mg katehina/mL ekstrakta.
Kod tretmanu defolijacije u periodu pojave šare najniža minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) je iznosila 0.0053 mg katehina/mL ekstrakta, a najveća je iznosila 0.0067 mg katehina/mL ekstrakta. Barem 50% ekstrakata ima 0.0057 mg katehina/mL ekstrakta ili manje te 0.0057 mg katehina/mL ekstrakta ili više. 25% ekstrakata ima 0.0055 mg katehina/mL

ekstrakta ili manje, a 25% ekstrakata 0.0066 mg katehina/mL ekstrakta ili više. Srednja vrijednost minimalnih inhibitornih koncentracija u ovom je tretmanu 0.0059 mg katehina/mL ekstrakta.

U kontrolnoj skupini najniža minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) je iznosila 0.0048 mg katehina/mL ekstrakta, a najveća je iznosila 0.0129 mg katehina/mL ekstrakta. Barem 50% ekstrakata ima 0.0061 mg katehina/mL ekstrakta ili manje te 0.0061 mg katehina/mL ekstrakta ili više. 25% ekstrakata ima 0.0049 mg katehina/mL ekstrakta ili manje, a 25% ekstrakata 0.0065 mg katehina/mL ekstrakta ili više. Srednja vrijednost minimalnih inhibitornih koncentracija u ovom je tretmanu 0.0058 mg katehina/mL ekstrakta.

Rezultati oba tretmana defolijacije, kao i kontrolne skupine su približno jednaki, te se statistički ne razlikuju značajno.



Slika 18. Prikaz utjecaja defolijacije na antibakterijsko djelovanje ekstrakata sorte Merlot na Gram-negativnu bakteriju *E. coli*

U tretmanu defolijacije u periodu cvatnje najniža minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) ekstrakata sorte Merlot na Gram-negativnu bakteriju *E. coli* je iznosila 0.0066 mg katehina/mL ekstrakta, a najveća je iznosila 0.0122 mg katehina/mL ekstrakta. Barem 50% ekstrakata ima 0.0115 mg katehina/mL ekstrakta ili manje te 0.0115 mg katehina/mL ekstrakta ili više. 25% ekstrakata ima 0.0067 mg katehina/mL ekstrakta ili manje, a 25% ekstrakata 0.0121 mg

katehina/mL ekstrakta ili više. Srednja vrijednost minimalnih inhibitornih koncentracija u provedenom tretmanu je 0.0101 mg katehina/mL ekstrakta.

Kod tretmanu defolijacije u periodu pojave šare najniža minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) je iznosila 0.0108 mg katehina/mL ekstrakta, dok je najveća iznosila 0.0132 mg katehina/mL ekstrakta. Barem 50% ekstrakata ima 0.0114 mg katehina/mL ekstrakta ili manje te 0.0114 mg katehina/mL ekstrakta ili više. 25% ekstrakata ima 0.0107 mg katehina/mL ekstrakta ili manje, a 25% ekstrakata 0.0126 mg katehina/mL ekstrakta ili više. Srednja vrijednost minimalnih inhibitornih koncentracija u ovom je tretmanu 0.0117 mg katehina/mL ekstrakta.

U kontrolnoj skupini najniža minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) je iznosila 0.0096 mg katehina/mL ekstrakta, a najveća je iznosila 0.0129 mg katehina/mL ekstrakta. Barem 50% ekstrakata ima 0.0122 mg katehina/mL ekstrakta ili manje te 0.0122 mg katehina/mL ekstrakta ili više. 25% ekstrakata ima 0.0097 mg katehina/mL ekstrakta ili manje, a 25% ekstrakata 0.0128 mg katehina/mL ekstrakta ili više. Srednja vrijednost minimalnih inhibitornih koncentracija u ovom je tretmanu 0.0116 mg katehina/mL ekstrakta.

Rezultati oba tretmana defolijacije, kao i kontrolne skupine su približno jednaki, te se statistički ne razlikuju značajno.

4. Rasprava

U ovom je radu istražen utjecaj različitih termina uklanjanja lišća na antibakterijsko i antioksidacijsko djelovanje te na ukupnu koncentraciju fenola u ekstraktima pokožice grožđa sorti Frankovka i Merlot.

Metodom Folin-Ciocalteu određena je ukupna koncentracija fenolnih spojeva kod obje ispitivane sorte te se pokazalo da je koncentracija fenolnih spojeva bila značajno veća kod ekstrakata koji su dobiveni iz grožđa koje je bilo podvrgnuto tretmanu defolijacije u odnosu na kontrolnu skupinu kod obje sorte grožđa. U slučaju Frankovke, koncentracija fenolnih spojeva je bila značajno veća u tretmanu defolijacije u periodu cvatnje u odnosu na tretman defolijacije u periodu pojave šare. S druge strane, kod sorte Merlot nema značajnih razlika u usporedbi različitih termina defolijacije. Moguće je zaključiti da tretman uklanjanja lišća rezultira povećanom koncentracijom fenolnih spojeva u pokožici grožđa, no da li će različiti termini uklanjanja lišća rezultirati različitim povećanjem koncentracije fenolnih spojeva vrsno je specifično za svaku pojedinu sortu grožđa. Povećan sadržaj fenolnih spojeva nakon tretmana defolijacije provedene prije cvatnje zabilježili su i Poni i sur. (2006). Prema istraživanju koje je proveo Rončević (2016) na sorti Frankovke, sadržaj ukupnih polifenola je bio značajno viši u tretmanu s defolijacijom u razdoblju šare, u odnosu na druga dva tretmana. Rana defolijacija sorte Nero d' Avola dovela je do povećanja ukupnog sadržaja antocijanina, flavonoida i polifenola (Verzera i sur., 2015). Prema istraživanju koje su proveli Risco i sur. (2013) pokazalo se da rana defolijacija djeluje pozitivno na sastav grožđa rodnih vinograda, a defolijacija provedena u vrijeme formiranja grozdova dovodi po povećanja sadržaja fenola u bobicama grožđa. Defolijacija provedena u punoj zrelosti grožđa na kultivaru Mandó iz jugoistočne Španjolske rezultirala je smanjenjem veličine grozda, ali i porastom koncentracije fenole, antocijanina i tanina u bobicama grožđa (Intrigliolo i sur., 2014). Prema istraživanju Murisiera i Ferrettia (2005.) defolijacija u početku zrenja grožđa je provođena tijekom pet godina na sorti Merlot, a rezultirala je povećanim koncentracijama ukupnih polifenola, antocijana kao i povećanjem intenziteta boje. Rana defolijacija, osobito defolijacija u periodu cvatnje je dovela do značajnog povećanja ukupne koncentracije polifenolnih spojeva (Mijowska i sur., 2016). Sadržaj fenola obzirom na provedeni tretman defolijacije se razlikuje od sorte do sorte. Pozitivno djelovanje uklanjanja lišća pokazalo se kod sorti Traminac i Manzoni bijeli te

Graciano i Carignan, dok kod Graševine i Grenache ili nije došlo do promjena, ili je došlo do pada sadržaja polifenola (Osrečak i sur., 2014; Tardaguila i sur., 2010).

Antioksidacijska aktivnost mjerena je DPPH metodom, a pokazalo se da su ekstrakti dobiveni iz pokožice grožđa koje je bilo podvrgnuto tretmanu defolijacije, neovisno o terminu defolijacije, imali značajno veću antioksidacijsku aktivnost u odnosu na kontrolnu skupinu. Jednaki utjecaji defolijacije su zabilježeni kod sorti Frankovka i Merlot. Kod sorte Frankovka, razlike između dva termina defolijacije, odnosno između defolijacije u periodu cvatnje i defolijacije u periodu pojave šare nisu se pokazale značajnima. Kod sorte Merlot je drugačija situacija. Defolijacija u periodu cvatnje rezultirala je značajno većom antioksidacijskom aktivnošću u usporedbi s defolijacijom provedenom u periodu pojave šare. Jerman i sur. (2011) su proveli istraživanje na sorti grožđa Pinot crni. Dobiveni rezultati ukazali su na to da rana defolijacija povećava antioksidacijsku aktivnost za 53% od prosjeka, u usporedbi s kontrolnom skupinom. Istraživanje koje su proveli Radovanović i sur. (2015) pokazalo je da je rana defolijacija sorte Cabernet Sauvignon rezultirala značajnim povećanjem koncentracija ukupnih fenola do 88.75%, ali i povećanjem antioksidacijske aktivnosti do 12.70%. u usporedbi s kontrolnom skupinom. Prema istraživanju koje su proveli Drenjančević i sur. (2017), rana je defolijacija djelovala na smanjenje veličine grozda, ali je značajno povećala antioksidacijsku aktivnost grožđa sorte Cabernet Sauvignon, iz čega se može zaključiti da tretman uklanjanja lišća rezultira manjom kvantitetom grožđa, kojeg odlikuje značajno veća kvaliteta.

Antibakterijsko djelovanje ekstrakata pokožice grožđa sorti Frankovka i Merlot određeno je metodom minimalne inhibitorne koncentracije (MIC). Pokazalo se da je kod sorte Frankovka defolijacija u periodu cvatnje imala najbolji utjecaj, odnosno rezultirala je najboljim antibakterijskim djelovanje ekstrakata u slučaju sve četiri ispitivane bakterije (*S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* i *E. coli*). Defolijacija u periodu cvatnje je pokazala statistički značajno bolje antibakterijsko djelovanje u usporedbi s tretmanom defolijacije u periodu pojave šare, kao i u usporedbi s kontrolnom skupinom, dok se razlike između kontrolne skupine i defolijacije u periodu pojave šare nisu pokazale značajnima u slučaju antibakterijskog djelovanja na bakteriju S. aureus. Kod antibakterijskog djelovanja na bakteriju *B. subtilis* nema značajnih razlika između različitih termina defolijacije, kao niti između tretmana defolijacije u periodu pojave šare i kontrolne skupine, ali postoji značajna razlika između tretmana defolijacije u periodu cvatnje i kontrolne skupine. Razlike između tretmana defolijacije u periodu cvatnje i tretmana defolijacije u periodu pojave šare statistički su značajne u slučaju bakterije *P. aeruginosa*, kao

i razlike između tretmana defolijacije u periodu cvatnje i kontrolne skupine, dok se razlike između tretmana defolijacije u periodu pojave šare i kontrolne skupine nisu pokazale značajnima. U usporedbi utjecaja različitih termina defolijacije na antibakterijsko djelovanje na bakteriju *E. coli* rezultati se nisu pokazali značajno različitima, ali značajne razlike postoje u usporedbi tretmana defolijacije u periodu cvatnje i kontrolne skupine. Kontrolna skupina se ne razlikuje značajno od tretmana defolijacije u periodu pojave šare. S druge strane, kod sorte Merlot se razlike u antibakterijskom djelovanju na sve četiri ispitivane bakterije (*S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* i *E. coli*) između različitih tretmana defolijacije nisu pokazale kao statistički značajne, kao niti razlike između tretmana defolijacije i kontrolne skupine. Iz navedenih rezultata se može zaključiti da je utjecaj defolijacije na antibakterijsko djelovanje ekstrakata pokožice grožđa vrsno specifično za svaku pojedinu sortu. Obzirom na to da do sada nema provedenih istraživanja na temu utjecaja defolijacije na antibakterijsko djelovanje grožđa, dobiveni se rezultati ne mogu uspoređivati s rezultatima iz drugih radova. U dosadašnjim je istraživanjima ispitivano antibakterijsko djelovanje grožđa, bez utjecaja tretmana defolijacije. Prema istraživanju koje su proveli Göktürk Baydar i sur. (2004) pokazalo se da 20%-tni ekstrakti sjemenki bobica grožđa imaju dobro antibakterijsko djelovanje na veliki broj bakterija, uključujući sve četiri bakterije ispitivane u ovom radu (*S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* i *E. Coli*). Izrazito dobro antibakterijsko djelovanje na *Heliobacter pylori* je pokazala i pokožica grožđa sorte Muškat, a nešto slabije sjemenke bobica iste sorte grožđa (Brown i sur., 2008). Katalinić i sur. (2010) su proveli istraživanje u kojem su proučavali antibakterijsko djelovanje ekstrakata pokožice grožđa 14 Dalmatinskih sorti na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije. Pokazalo se da su ekstrakti pokožice grožđa bijelih sorti imali bolje antibakterijsko djelovanje, što je bilo suprotno očekivanjima, kao i to da nije bilo značajne razlike između djelovanja na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije. Ekstrakti pokožice i sjemenki grožđa sorte Muškat crni pokazali su vrlo dobro antibakterijsko djelovanje na Gram-pozitivne, kao i na Gram-negativne bakterije. Smatra se da mehanizam antibakterijskog djelovanja čine interakcija između molekula sterola prisutnih u ekstraktima pokožice i sjemenki grožđa sa staničnom stijenkom i membranom bakterija, što vodi do promjena u primarnoj strukturi stanične stijenke i mambrane bakterija, a krajnji rezultat je nastanak pora i razgradnja bakterijskih komponenti (Nirmala i Narendhirakannan, 2011).

Pored utjecaja defolijacije, na ispitivane aktivnosti utječu i klimatski uvjeti, odnosno temperatura, količina padalina i slično (Jerman i sur., 2011). Provedena su brojna istraživanja, od kojih većina navodi pozitivna djelovanja defolijacije, u vidu povećanja količine glikozida,

ukupnih flavonola i antocijana, zatim ubrzano nakupljanje šećera, poboljšanje fotosintetske aktivnosti listova i metabolizma biljke te veću otpornost grožđa na zarazu sivom plijesni i mikroorganizmima (Lemut i sur., 2011; Kozina, 1999; Hunter i sur., 1991; Bledsoe i sur., 1998; Spayda i sur. 2002).

Provedeno istraživanje utjecaja različitih termina defolijacije na antioksidacijsku aktivnost i antibakterijsko djelovanje ekstrakata pokožice grožđa sorti Frankovka i Merlot je prvo istraživanje takvog tipa na ovom području te je stoga od velikog značaja. Dosadašnja su istraživanja obuhvatila utjecaje defolijacije na ukupni sadržaj polifenolnih spojeva u grožđu i vinu, sadržaj antocijana u grožđu i vinu, kemijski sastav mošta (sadržaj glavnih organskih kiselina, šećera, pH vrijednost), rodnost sorte te utjecaj defolijacije na dozrijevanje (Jagatić Korenika i sur., 2015; Rončević, 2015; Ivanova i sur., 2010; Lutz i sur., 2012).

Grožđe, odnosno ispitivani ekstrakti pokožice grožđa pokazali su dobru antibakterijsku kao i antioksidacijsku aktivnost, koje su od izuzetne važnosti kada je u pitanju ljudsko zdravlje. Pozitivna djelovanja grožđa u vidu sprječavanja nastanka određenih bolesti, ili barem njihove progresije su vrlo zanimljiva i značajna za istraživanje. Stoga bi daljnja istraživanja po pitanju djelovanja grožđa i njihovih ekstrakata trebala obuhvatiti prvenstveno više različitih metoda ekstrakcija, a naposljetku i metoda ispitivanja njihova sastava i djelovanja. Poželjno bi bilo usporediti metode ekstrakcija s otapalima različite polarnosti, zatim metode mikrovalne ekstrakcije, ekstrakcije superkritičnim fluidima, toplinskom obradom u kombinaciji s učinkom različitih novih tehnologija kao što su ultrazvuk, visoki hidrostatski tlak i pulsirajuća električna polja, zatim utvrditi sastav antocijana, ukupnih flavonoida, kondenziranih tanina, analizu fenola pomoću RP-HPLC metode. U daljnja istraživanja poželjno je uključiti disk difuzijsku metodu za proučavanje antibakterijskog djelovanja, zatim FRAP (*engl*. Ferric Reducing Antioxidant Power) metodu po Benzie i Strain (1996) i ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline)) metodu po Arts i sur. (2001) za određivanje antioksidacijske aktivnosti. Rezultati dobiveni iz više različitih metoda bi mogli dati preciznije, statistički točnije i za znanost relevantnije podatke, koji bi omogućili detaljniji uvid u široki spektar korisnih značajki grožđa te pokazati izvedivost i selektivnost u svrhu optimalne ekstrakcije.

5. Zaključci

Analizom utjecaja defolijacije na koncentraciju ukupnih fenola, antioksidacijsku aktivnosti te antibakterijsko djelovanje ekstrakata pokožice grožđa sorti Frankovka i Merlot, ovim su istraživanjem izvedeni sljedeći zaključci:

- Tretmani defolijacije značajno su povećali koncentraciju ukupnih fenola u ekstraktima pokožice grožđa kod obje ispitivane sorte, Frankovka i Merlot;
- Tretman defolijacije u periodu cvatnje je kod sorte Frankovka bio uspješniji, odnosno rezultirao je većim koncentracijama ukupnih fenola u ekstraktima pokožice grožđa u usporedbi s tretmanom defolijacije u periodu pojave šare;
- Tretmani defolijacije značajno su povećali antioksidacijsku aktivnost ekstrakata pokožice grožđa kod obje ispitivane sorte, Frankovka i Merlot;
- Tretman defolijacije u periodu cvatnje je kod sorte Merlot bio uspješniji u odnosu na tretman defolijacije u periodu pojave šare, odnosno rezultirao je značajno većom antioksidacijskom aktivnošću ekstrakata pokožice grožđa;
- Tretman defolijacije u periodu cvatnje značajno je povećao antibakterijsko djelovanje ekstrakata pokožice grožđa kod sorte Frankovka u odnosu na kontrolnu skupinu;
- Tretman defolijacije u periodu cvatnje je rezultirao značajno boljim antibakterijskim djelovanjem ekstrakata pokožice grožđa kod sorte Frankovka u odnosu na tretman defolijacije u periodu pojave šare u slučaju bakterija *S. aureus* i *P. aeruginosa.*

6. Literatura

Arts MJTJ. Haenen GRMM.Voss H. P. Bast A. 2001. Masking of antioxidant capacity by the interaction of flavonoids with protein. Food Chem. Toxicol. 39:787–791.

Benzie IFF. Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of „Antioxidant Power“: The FRAP assay. Anal. Biochem. 239:70-76.

Bešlić Z, Todić S, Marković N, Atanacković Z. 2010. Effect of pruning intensity on berry skin and must composition on cv. Blaufränkisch (V. vinifera L.). Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu, Serbia 1153-1157.

Bledsoe AM. Kliewer WM. Marois JJ. 1988. Effects of timing and severity of leaf removal on yield and fruit composition of Sauvignon blanc grapevines. American Journal of Enology and Viticulture 39(1): 49-54.

Bondet V, Brand-Williams W, Berset C. 1997. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie 30:609-615.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie 28:25-30.

Brown CJ, Huang G, Haley-Zitlin V, Jiang X. 2008. Antibacterial Effects of Grape Extracts on Helicobacter pylori. Applied and Environmental Microbiology, South Carolina. 848-852.

Curnutte JT, Babior BM. Chronic granulomatous disease. 1987. Adv Hum Genet 16:229-45.

de Magalhães LMA. 2007. Development of automatic methods based on flow techniques for evaluation of antioxidant capacity in pharmaceutical and food products. Disertacija, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Di Stefano R, Cravero M, Gentilini N. 1989. Metodi per lo studio dei polifenoli dei vini. L’ Enotecnico Maggio 25(5)83-89.

Downey MO, Dokoozlian NK, Krstic MP. 2006. Cultural Practice and Environmental Impacts on the Flavonoid Composition of Grapes and Wine: A Review of Recent Research. Am. J. Enol. Vitic. 57: 257-268.

Drenjančević M, Jukić V, Zmaić K, Kujundžić T, Rastija V. 2017. Effects of early leaf removal on grape yield, chemical characteristics, and antioxidant activity of grape variety Cabernet Sauvignon and wine from eastern Croatia. Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science 67:705-711.

Hunter JJ, De Villiers OT, Watts JE. 1991. The Effect of Partial Defoliation on Quality Characteristics of Vitis vinifera L. cv. Cabernet sauvignon Grapes. II. Skin Color, Skin Sugar and Wine Quality. Am. J. Enol. Vitic 42: 13-18.

Gacche RN, Gond DS, Dhole NA, Dawane BS. Coumarin Schiff-bases: As antioxidant and possibly anti-inflammatory agents. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry 21:157–161.

Göktürk Baydar N, Özkan G, Sağdiç O. 2004. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (Vitis vinifera L.) extracts. Food Control 15:335-339.

Intrigliolo DS, Llacer E, Revert J, Esteve MD, Climent MD, Palau D, Gomez I. 2014. Early defoliation reduces cluster compactness and improves grape composition in Mandó, anautochthonous cultivar of Vitis vinifera from southeastern Spain. Scientia Horticulturae 167:71-75.

Ivanova V, Stefova M, Chinnici F. 2010. Determination of the polyphenol contents in Macedonian grapes and wines by standardized spectrophotometric methods. Journal of the Serbian Chemical Society 45-59.

Jackson RS 2008. Wine Science: Principles and Applications. Vol. 3 Elsevier Academic Press Amsterdam/Boston.

Jagatić Korenika AM, Naletilić I, Mihaljveić Žulj M, Puhelek I, Jeromel A. 2015. Utjecaj roka berbe i temperature maceracije na polifenolni sastav grožđa i vina sorte Frankovka (Vitis vinifera L.). Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Glasnik zaštitte bilja 5:92-100.

Jerman T, Stenard L, Trošt K. 2011. The impact of early leaf removal on polyphenol/anthocyanin content and in vitro antioxidant potential of 'Pinot Noir' grapes from Vipava Valley. University of Nova Gorica, Wine Research Centre, Slovenia 936-940.

Katalinić V, Smole Možina S, Skroza D, Generalić I, Abramovič H, Miloš M, Ljubenkov I, Piskernik S, Pezo I, Terpinc P, Boban M. 2010. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 Vitis vinifera varieties grown in Dalmatia (Croatia). Food Chemistry 119:715–723.

Kennedy JA, Matthews MA, Waterhouse AI. 2002. Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids. Am. J. Enol. Vitic. 53: 268- 274.

Kozina B, 1999. Utjecaj defolijacije na dozrijevanje grožđa i mladica sorte Graševine (Vitis vinifera L.). Zemjodelski fakultet Skopje, Skopje, Makedonija.

Lemut MS, Trost K, Sivilotti P, Vrhovsek U. 2011. Pinot Noir grape colour realted phenolics as affected by leaf removal treatments in the Vipava Valley. J. food Comp. Anal. 24: 777-784.

Lutz M, Cajas Y, Henrı´quez C. 2012. Phenolics content and antioxidant capacity of Chilean grapes cv. Paı´s and Cabernet Sauvignon Contenido de fenoles y capacidad antioxidante en uvas chilenas cv. Paı´s y Cabernet Sauvignon. CyTA – Journal of Food 10: 251-257.

Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. 2000. Establishment of Pseudomonas aeruginosa infection: lessons from a versatile opportunist. Microbes Infect. 2:1051–1060.

Marinčić M. 2015. Određivanje ukupnih fenola i antocijana u komini grožđa sorte Merlot. Prehrambeno – biotehnološki fakultet, Sveučitište u Zagrebu.

Matés JM, Sánchez-Jiménez F. 1999. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. Front Biosci, 4:D339-45.

McFarland J. 1907. The nephelometer:an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. JAMA. 49(14):1176–1178.

Mirošević N, Kontić JK. 2008. Vinogradarstvo. Nakladni zavod Globus, Zagreb, Hrvatska, 357 pp.

Mijowska K, Ochmian I, Oszmia´nski J. 2016. Impact of Cluster Zone Leaf Removal on Grapes cv. Regent Polyphenol Content by the UPLC-PDA/MS Method. Molecules, Volume 21:1688.

Molyneux P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin Journal of Science and Technology 26:211-219.

Murisier F, Ferretti M. 2005. Trial on leaf removal in the zone grape bunch of Merlot grapevines in Ticino, Switzerland. Effects on the quality of grapes and wines, Foodand Agriculture Organization of the United Nations, Agris, Volume 36.

Naglić T, Hajsig D, Madić J, Pinter LJ. 2005. Veterinarska mikrobiologija – specijalna bakteriologija i mikrobiologija. Veterinarski fakultet Sveuĉilišta u Zagrebu. Hrvatsko mikrobiološko društvo 43 - 194.

Nićiforović N, Mihailović V, Mladenović M, Solujić S, Stanković M, Ivanović D. 2011. Antioksidativna aktivnost tri biljne vrste roda Verbascum. XVI Savetovanje o biotehnologiji-Zbornik radova 16:563-567.

Nirmala JG, Naredhirakannan RT. 2011. In vitro antioxidant and antimicrobial activities of grapes (*Vitis vinifera* L.) seed and skin extracts - Muscat variety. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 3: 242-249.

Osrečak M. 2014. Utjecaj djelomične defolijacije i solarizacije na polifenolni sastav vina kultivara Merlot, Teran i Plavac mali (*Vitis vinifera* L.). Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Peña-Olmosand JE, Casierra-Posada F. 2015. Fruit quality and production of *Vitis vinifera L*. Chardonnay affected by partial defoliation in tropical highlands. Revista Facultad Nacional de Agronomia 68 (2): 7581-7588.

Poni S, Casalini L, Bernizzoni F, Civardi S, Interiri C. 2006. Effects of Early Defoliation on Shoot Photosynthesis, Yield Components, and Grape Composition. Istituto di Frutti-Viticoltura, Università Cattolica del Sacro Cuore, Italy.

Preiner D, Karoglan Kontić J, Maletić E, Marković Z, Tomaz I. 2014. Sadržaj polifenola u prošeku od hrvatskih autohtonih sorata vinove loze. Glasnik zaštite bilja 5: 75 – 80.

Radovanović V, Stefanović D, Radovanović B. 2015. Uticaj selektivnog uklanjanja listova vinove loze na kvalitet crvenog vina. Journal on Processing and Energy in Agriculture 19(4):215-218.

Rauha JP, Remes S, Heinonen M, Hopia A, Kähkönen M, Kujala T, Pihlaja K, Vuorela H, Vuorela P. 2000. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. Int J Food Microbiol. 56(1):3-12.

Reynolds AG, Wardle DA, Hall JW, Dever M. 1995. Fruit maturation of four Vitis vinifera cultivars in response to vineyard location and basal leaf removal. American Journal of Enology and Viticulture 46 (4): 542-558.

Ribéreau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dubourdieu D. 2000. Handbook of Enology Volume 2: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, Engleska.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends in Plant Science 2: 152-159.

Risco D, Pérez D, Yeves A, Casteland JR, Intrigliolo DS. 2013. Early defoliation in a temperate warm and semi-arid Tempranillo vineyard: vine perfomance and grape composition. Australian Journal of Grape and Wine Research 20: 111-122.

Rončević Branimir. 2016. Utjecaj različitih termina defolijacije na neke kvalitativne parametre kultivara Frankovka (*Vitis vinifera* L.) u vinogorju Đakovo u 2015. godini. Poljoprivredni fakultet u Osijeku.

Rousseaux S, Diguta CF, Radoï-Matei F, Alexandre H, Guilloux-Bénatier M. 2014. Non-Botrytis grape-rotting fungi responsible for earthy and moldy off-flavors and mycotoxins (REVIEW). Food Microbiology 38: 104-121.

Shih M-H, Su Y-S, Wu C-L. 2007. Synthesis of aromatic substituted hydrazinothiazole derivates to clarify structural characterization and antioxidant activity between 3-arylsydnonyl and aryl substituted hydrazino-thiazoles. Chemical & Pharmaceutical Bulletin 55:1126-1135.

Sowndhararajan K, Siddhuraju P, Manian S. 2011. Antioxidant and free radical scavenging capacity of the underutilized legume, Vigna vexillata (L.) A. Rich. Journal of Food Composition and Analysis 24:160–165.

Spayd SE, Tarara JM, Mee DL, Ferguson JC. 2002. Separation of sunlight and temperature effects on the composition of Vitis vinifera cv. Merlot Berries, American Journal of Enology and Viticulture 53 (3): 171-182.

Tardagulia J, Martinez de Toda F, Poni S, Diago MP. 2010. Impact of Early Leaf Removal on Yield and Fruit and Wine Composition of Vitis vinifera L. Graciano and Carignan. American Journal of Enology and Viticulture 61:3: 372-381.

Tratnik M. 2016. Izolacija bioaktivnih spojeva iz pokožice i sjemenki komine grožđa sorte Merlot. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Tsao R. 2010. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. Nutrients 2:1231-1246.

Valls J, Millán S, Martí MP, Borrás E, Arola L. 2009. Advanced separation methodes of food anthocyanins, isoflavones and flavanol 1216:7143-7172.

Verzera A, Tripodi G, Dima G, Condruso C, Scacco A, Cincotta F, Letizia Giglio DM, Santangeloi T, Sparacio,A. 2015. Leaf removal and wine composition of Vitis vinifera L. cv.

Nero d'Avola: the volatile aroma constituents. Journal of the Science of Food and Agriculture 96:150-159.

WEB:

1. http://www.slavonska-kosarica.hr/wp-ontent/uploads/2014/02/grozdje_frankovka1.jpg
2. http://vinopedia.hr/wiki/images/thumb/3/37/Merlot.jpg/200px-Merlot.jpg
3. http://www.diffen.com/difference/Gram-negative_Bacteria_vs_Gram-positive_Bacteria
4. http://www.pfos.unios.hr/hr/o-fakultetu/ustrojstvo-fakulteta/pokusalista/mandicevac/