

**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Nina Macut**

7507/PT

**POLIFENOLNI SASTAV VINA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Osnove prehrambenih tehnologija

**Mentorica:** prof. dr. sc. *Karin Kovačević Ganić*

**Zagreb, 2019.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija**

**Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo**  
**Laboratorij za tehnologiju i analitiku vina**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti**  
**Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija**

### POLIFENOLNI SASTAV VINA

*Nina Macut, 0066250341*

#### **Sažetak**

Polifenoli su esencijalne molekule za fiziologiju biljaka zbog svoje uključenosti u različite funkcije poput rasta, pigmentacije, rezistencije na patogene. Polifenolni spojevi u crnom vinu imaju izrazito značajnu ulogu zbog svog utjecaja na senzorska svojstva kao što su gorčina, trpkoca i boja. Prisutnost u većoj ili manjoj količini također utječe na stabilnost i dozrijevanje vina, na njegov miris i okus te na hranjive vrijednosti vina. Sastav polifenolnih spojeva i njihov međusobni odnos je određen sortom grožđa, ali značajan utjecaj imaju i uvjeti uzgoja, klima te godina berbe. Zbog svojih svojstava mogu se koristiti pri određivanju autentičnosti vina. Veće ili manje količine polifenolnih spojeva u vinu ovise o sorti, stupnju zrelosti pri berbi, zdravstvenog stanja grožđa i niza drugih čimbenika, a ponajviše o tehnološkom postupku prerade.

**Ključne riječi:** antioksidans, grožđe, polifenoli, vino, vinova loza

**Rad sadrži:** 20 stranica, 9 slika, 4 tablice, 45 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentorica:** prof. dr. sc. Karin Kovačević Ganić

**Datum obrane:** 18. rujan 2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
University undergraduate study Food Technology

Department of Food Engineering  
Laboratory for Technology and Analysis of Wine

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Food Technology

### The polyphenolic composition of wine

*Nina Macut, 0066250341*

#### **Abstract:**

Phenolic compounds are essential molecules for plant physiology because of their involvement in various functions such as growth, pigmentation and pathogen resistance. Phenolic compounds in red wine play a particularly significant role due to their influence on sensory characteristics such as bitterness, agitation and color. The presence of these compounds in greater or lesser amount also affects the stability and maturation of the wine, its aroma and taste and the nutritional value of the wine.

The composition of the phenolic compounds and their interrelationship is determined by the grape variety, but the growing conditions, the climate and the year of harvest. Due to their properties, they can be used in determining the authenticity of wine. Higher or lower amounts of phenolic compounds in wine depend on the variety, the degree of ripeness at harvest, the health status of the grapes and a number of other factors, but most notably is the technological processing process.

**Keywords:** antioxidant, grapes, grapevine, polyphenols, wine

**Thesis contains:** 20 pages, 9 figures, 4 tables, 45 references

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** Karin Kovačević Ganić, PhD, Full professor

**Defence date:** 18 September 2019

## Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Vinova loza.....	2
3. Fenolni spojevi .....	4
3.1. Neflavonoidi.....	6
3.1.1. Fenolne kiseline.....	6
3.1.2. Stilbeni .....	7
3.2. Flavonoidi.....	8
3.2.1. Flavani.....	9
3.2.2. Flavoni.....	10
3.2.3. Antocijanidini.....	11
3.2.4. Tanini .....	11
4. Antioksidansi u vinu .....	12
5. Ekstrakcija polifenola.....	13
6. Metode za analizu i određivanje polifenola u vinu .....	13
6.1. Tankoslojna kromatografija (TLC).....	13
6.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC).....	14
6.3. Gel-propusna kromatografija .....	14
6.4. Plinska kromatografija (GC).....	15
7. Čimbenici koji utječu na polifenolni sastav vina .....	15
8. Utjecaj polifenola na zdravlje .....	16
9. Zaključak .....	17
10. Popis literature .....	18

## 1. Uvod

Vino je alkoholno piće koje se proizvodi fermentacijom grožđa, ploda biljke vinove loze (lat. *Vitis vinifera*), tj. biljke penjačice iz porodice *Vitaceae*, dok se ono zakonom definira kao poljoprivredno prehrambeni proizvod koji ima nutritivnu vrijednost i terapijski učinak. Osnovni koraci proizvodnje vina su berba i prerada grožđa, alkoholna fermentacija, stabilizacija i njega vina, skladištenje te distribucija. Na samu kvalitetu vina utječu izbor sorte vinove loze, agroekološki uvjeti uzgoja, procesi prerade grožđa, postupci tijekom proizvodnje te njega i čuvanje vina.

Za kvalitetno vino koje će sadržati sve kvalitetne komponente sadržane u samom grožđu bitno je odrediti optimalan trenutak berbe koji se određuje indeksom zrelosti grožđa, tj. određivanjem udjela šećera i organskih kiselina. Fenolna zrelost grožđa označava se određivanjem ukupnog udjela fenolnih spojeva (ukupnih fenola kod bijelog grožđa, ukupnih antocijana i tanina kod crnog grožđa) dok se za utvrđivanje aromatske zrelosti grožđa određuje u aromatski spojevi. Važan čimbenik kod vina je i njegova aroma koja je rezultat interakcije kemijskog sastava te mirisa i okusa. Komponente arome se mogu podijeliti na hlapljive i nehlapljive spojeve. Među hlapljive se ubrajaju viši alkoholi, terpeni, esteri, karbonilni spojevi, hlapljive kiseline, spojevi sa sumporom te hlapljivi fenoli dok nehlapljive čine šećeri, organske kiseline, fenolni spojevi i mineralne komponente.

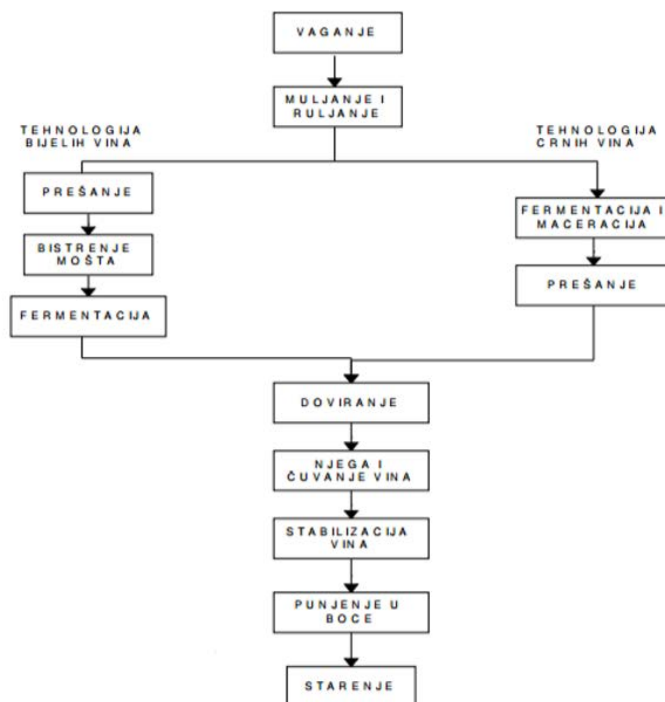
Grožđe, plod vinove loze, poput i nekog drugog voća i povrća sadrži veću količinu i raznolikost fenola. Fenolni spojevi su nosioci karakterističnog okusa, boje, mirisa te nutritivne vrijednosti, a također su i jaki antioksidansi. Najznačajniji polifenoli u vinu su epikatehin i kvercetin koji imaju antikancerogeno djelovanje, katehin koji sprječava nastajanje krvnih ugrušaka te resveratrol koji sprječava oksidaciju lošeg kolesterola, smanjuje opasnost nastajanja krvnih ugrušaka te štiti od upala unutrašnjih stijenki arterija.

## 2. Vinova loza

Vinova loza (lat. *Vitis vinifera*) porijeklom je iz Sredozemlja, a danas se uzgaja po cijelom svijetu. Latinsko ime potječe od riječi *viere* što znači vezati te *vinifera* koji se može prevesti kao onaj koji daje vino. Grožđe roda *Vitis* bogatije je fenolnim komponentama od drugog voća. Osim grozdova za prehranu i vino koriste se i listovi i sjemenke. Što se tiče samog grozda 3-7% otpada na peteljku, 0-6% na sjemenke, 8-20% na kožicu te 75-85% na meso. Iako sjemenka sama po sebi zauzima najmanji dio grozda u njoj se nalazi čak od 20 do 55% fenolnih spojeva od ukupnih fenola bobice.

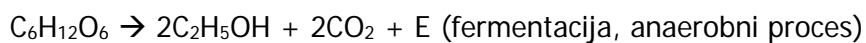
Rast i razvoj vinove loze, kao i sve druge biljke, ovisi o brojnim okolišnim čimbenicima kao što su temperatura, vlaga, svjetlost, vjetrovi, vrsta i sastav tla te sam položaj vinograda.

Što se tiče same proizvodnje vina bitno je naglasiti kako se kod proizvodnje bijelih vina fermentira mošt, a kod crnih vina se fermentira mošt zajedno s bobicama što se naziva maceracijom. Dakle u proizvodnji bijelih vina, nakon procesa muljanja i ruljanja slijedi odvajanje mošta od masulja te nakon toga alkoholna fermentacija mošta dok se kod proizvodnje crnih vina provodi alkoholna fermentacija masulja. Najčešće greške u proizvodnji vina su octikavost mošta, pojava sumporovodika, zastoj fermentacije, oksidacija, nizak ili visok alkohol te strani mirisi.



Slika 1. Shema proizvodnje vina (Kovačević Ganić, 2018)

Glavni razlog octikavosti mošta je oštećenje grožđa koje se može pojaviti prilikom berbe ili prerade ili ukoliko se predugo čega na preradu nakon same berbe. Pojava sumporovodika se očituje ukoliko se mošt ne prozračuje tijekom vrenja, ne koriste selekcionirani kvasci te ne dodaje hrana za kvasce. Strani mirisi se mogu pojaviti uslijed loših uvjeta skladištenja i starenja, a zastoj fermentacije se javlja zbog nepovoljne temperature ili loše pripreme kvasaca. Alkoholna fermentacija je biokemijski proces u kojem dolazi do pretvorbe šećera u etanol i ugljikov dioksid kao glavne produkte te brojne sekundarne produkte kao što su glicerol, organske kiseline, esteri, viši alkoholi, itd. Nastaje i određena količina energije koja se manifestira kao toplina, a kao uzročnici fermentacije koriste se kvasci koji su ili dio prirodne mikroflore ili kao starter kulture, tj. selekcionirani kvasci. Kao glavni kvasac u proizvodnji vina koristi se kvasac roda *Saccharomyces* i podvrsta *Saccharomyces cerevisiae*. Nakon alkoholne fermentacije vino dozrijeva određeno vrijeme tijekom kojeg se odvijaju određene promjene koje utječu na organoleptička svojstva. U dozrijevanje se ubrajaju sve promjene koje nastaju nakon završetka vrenja, a uzrokuju bistrenje i izgradnju okusa.



Zajedno s kvascima, bakterije mliječne kiseline su najvažniji mikroorganizmi u proizvodnji vina. Kvasci su odgovorni za alkoholnu fermentaciju, a bakterije mliječne kiseline provode malolaktičku fermentaciju (MLF) koja se u povoljnim uvjetima odvija odmah nakon alkoholnog vrenja. Malolaktička fermentacija smanjuje kiselost vina te pridonosi mikrobnj stabilnosti gotovog proizvoda i utječe na njegova organoleptička svojstva. Bakterije mliječne kiseline mogu biti prisutne u različitim koracima proizvodnje vina, mogu biti izolirane iz lišća vinove loze, grožđa, bačvi ili neke druge opreme iz vinarije. One prisutne u prvim koracima proizvodnje vina pripadaju različitim vrstama, najčešće homofermentativnim. Najzastupljenije su *Lactobacillus plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. hilgardii*, *Leuconostoc mesenteroides* i *Pediococcus damnosus*, a u manjoj mjeri su pronađene i *Oenococcus oeni* i *Lb. brevis*. Nakon malolaktičke fermentacije sposobnost preživljavanja bakterija ovisi o uvjetima medija, posebno o pH vrijednosti, količini etanola te koncentraciji  $\text{SO}_2$ . U nekim slučajevima razvoju bakterija mliječne kiseline i MLF su nepredvidivi te se to može dogoditi i tijekom alkoholne fermentacije, skladištenja ili starenja što može dovesti do promjene sastava vina i samim time do promjene njegovog sastava čak do te mjere da ne bude zadovoljavajuće za konzumaciju (García-Ruiz i sur., 2008).

Arome vina potječu od estera, fenola i ostalih aromatičnih tvari koje iz grožđa prelaze u mošt, a potom i u vino (Pichler i sur., 2015). Primarne, voćne i cvjetne arome, vinu daje grožđe dok sekundarne arome nastaju tijekom proizvodnje, a tercijarne nastaju odležavanjem u boci.

Osim arome, jedna od važnijih karakteristika vina, posebice crnih, je boja čiji su glavni izvor u crnim vinima antocijanini i njihovi derivati koji se formiraju i ekstrahiraju tijekom procesa vinifikacije (Gabrielyan i Kazumyan, 2018).

### **3. Fenolni spojevi**

Fenolni spojevi su spojevi u kojima je hidroksilna skupina (OH) direktno vezana na aromatski ili benzenski prsten, a ukoliko sadrže dvije ili više hidroksilnih skupina nazivaju se polifenolima. Prisutnost polifenola utječe na stabilizaciju i čuvanje vina, na boju, miris i okus te na hranjivu vrijednost te je zbog toga više razloga za njihovu identifikaciju i određivanje u vinu. Masene koncentracije, posebice u crnim vinima, iznose od 1000 do 1300 mg polifenola po litri (Rastija i Medić-Šarić, 2009). Zbog brojnih pozitivnih učinaka polifenola na organizam koriste se brojne metode kako si se analizirale komponente u vinu. Koriste se kromatografske metode (TLC i HPLC) te vezani sustavi tekućinske ili plinske kromatografije s masenom spektrometrijom, kapilarna elektroforeza, tekućinska kromatografija s nuklearnom magnetskom rezonancijom i ciklička voltometrija koja omogućava brzo otkrivanje fenolnih antioksidansa (Rastija i Medić-Šarić, 2009). Uključuju mnoštvo spojeva različite kemijske strukture, a s obzirom na tu veliku raznovrsnost njihova klasifikacija je složena (Kurtagić, 2017). Zbog nezasićenih dvostrukih veza i hidroksilnih skupina osjetljivi su na oksidaciju što ih čini dobrim antioksidansima. Fenolni spojevi dijele se u dvije skupine, neflavonoidi i flavonoidi.

Najmanja količina fenolnih spojeva nalazi se u soku grožđa, nešto više je sadržano u kožici, a najveća količina prisutna je u samoj sjemenci grožđa. Procjenjuje se da sjeme sadrži 65% polifenola, stabljika 22%, kožica 12%, a pulpa 1% (Mulero i sur., 2015).

Glavni prirodni konzervansi u crvenom vinu su polifenoli. Tijekom starenja vina u boci oni reagiraju s pigmentima i kiselinama te stvaraju nove spojeve.

Fenolni spojevi koji se nalaze u vinu većinom potječu iz grožđa, no neki mogu biti i iz mikroba te hrasta zbog čuvanja u hrastovim bačvama. U bijelom vinu najvažniji fenolni spoj je hidrokscimetna kiselina koja pridonosi vizualnoj kvaliteti bijelog vina, dok su u crnom vinu najvažniji tanini i antocijani (Kennedy, 2008).



**Tablica 1.** Strukturne klase fenola (Kurtagić, 2017)

Redni broj	Broj C atoma	C - skelet	Klase biljnih fenola
1.	6	C6	jednostavni fenoli
2.	7	C6-C1	Hidroksibenzoati
3.	8	C6-C2	acetofenoni i fenilacetati
4.	9	C6-C3	hidroksicinamati, fenilpropeni,
5.	10	C6-C4	kumarini i hromoni
6.	13	C6-C1-C6	Naftokinoni
7.	14	C6-C2-C6	Ksantoni
8.	15	C6-C3-C6	stilbeni i antrahinoni
9.	18	(C6-C3) <sub>2</sub>	flavonoidi
10.	30	(C6-C3-C6) <sub>2</sub>	Lignani
11.	N	(C6) <sub>n</sub>	bioflavonoidi i katehol melanini
12.	N	(C6-C3) <sub>n</sub>	Lignini
13.	N	(C6-C3-C6) <sub>n</sub>	kondenzirani tanini

Osim vina od grožđa, voćna vina su također bogat izvor hranjivih sastojaka u kojima se nalaze brojni fenolni spojevi među kojima se nalaze i flavonoidi i neflavonoidi. Iako je u zadnje vrijeme povećana potražnja za voćnim vinima, njihov fenolni sastav proučavan je u znatno manjoj mjeri. Istraživanja koja su i provedena vezano za voćna vina pretežito su fokusirana na ukupan sadržaj fenola i antioksidativnu aktivnost. Neka od voćnih vina, kao što su od kupina, bundeve, borovnice i crnog ribiza pokazala su visok sadržaj fenola i antioksidacijsku aktivnost koja se čak može usporediti s onima u crnom vinu. Osim toga, ekstrakti kupine, crne maline, borovnice, brusnice, crvene maline i jagode, za koje se pokazalo da su bogati polifenolima, pokazali su važnu biološku aktivnost inhibirajući umnožavanje stanica uzročnika raka dojke (MCF-7), debelog crijeva (HT-29, HCT116) prostate (LNCaP) i stimuliranje brojnih drugih stanica (Ljevar i sur., 2016).

**Tablica 2.** Spektrometrijska karakterizacija ukupnih fenola i antocijana u različitim komercijalnim voćnim vinima (Ljevar i sur., 2016)

Voćno vino	γ (ukupni fenoli kao GAE)		γ (ukupni antocijani)	
	mg/L		mg/L	
	Opseg	Prosjek	Opseg	Prosjek
Kupina	1055,0-2704,5	1936,3	23,2-216,6	90,2
Trešnja	1081,4-2711,4	2074,9	55,1-483,0	244,0
Malina	1199,1-1840,0	1599,7	117,3-160,6	134,8
Crni ribiz	940,9-3086,4	2013,6	70,9-430,1	250,5
Jagoda	670,5-833,6	752,0	Tragovi-8,3	4,2
Jabuka	224,6-644,6	449,7	/	/

### 3.1. Neflavonoidi

Neflavonoidi su spojevi jednostavnije građe koji se sastoje od jednog aromatskog prstena, a u njih ubrajamo fenolne kiseline i stilbene.

#### 3.1.1. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline mogu se podijeliti u dvije osnovne skupine: derivati hidroksicimetne i derivati hidroksibenzojeve kiseline. Antioksidativna aktivnost fenolnih kiselina raste s porastom broja hidroksilnih skupina, a prisutne su u nekoliko dijelova grožđa dok su većinom sadržane u njegovom soku. U bijelim sortama grožđa najzastupljenije su u mesu bobice, a u crnim sortama u kožici (Rastija i sur., 2016).

Hidroksicimetne kiseline su najznačajniji fenoli bijelih vina, opće strukture C6-C3, a glavni predstavnici su ferulinska kiselina, kava-kiselina, sinapinska kiselina i *p*-kumarinska kiselina.

Derivati hidroksibenzojeve kiseline nastaju direktno iz benzojeve kiseline, opća struktura im je oblika C6-C1, vrlo ih je malo u grožđu, a u njih kao glavne predstavnike ubrajamo galnu, *p*-hidroksibenzojevu, siriginsku i vanilinsku kiselinu.

Provedena su istraživanja kojima je dokazano kako se tijekom fermentacije i starenja vina odvijaju različite reakcije tijekom kojih hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline mijenjaju

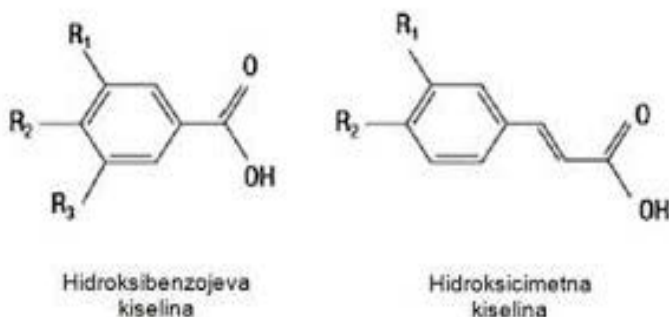
svoje oblike, a također je potvrđeno kako neke od ovih kiselina sudjeluju i u posmeđivanju vina te stvaranju taloga (Budić-Leto i Lovrić, 2002).

**Tablica 3.** Derivati hidroksibenzojeve kiseline (Garrido i Borges, 2013)

Derivati hidroksibenzojeve kiseline	R1	R2	R3
Galna kiselina	OH	OH	OH
<i>p</i> -hidroksibenzojeva kiselina	H	OH	H
Siriginska kiselina	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
Vanilinska kiselina	OCH <sub>3</sub>	OH	H

**Tablica 4.** Derivati hidroksicimetne kiseline (Garrido i Borges, 2013)

Derivati hidroksicimetne kiseline	R1	R2	R3
Ferulinska kiselina	OCH <sub>3</sub>	OH	H
<i>p</i> -kumarinska kiselina	H	OH	H
Kava-kiselina	OH	OH	H
Sinapinska kiselina	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>



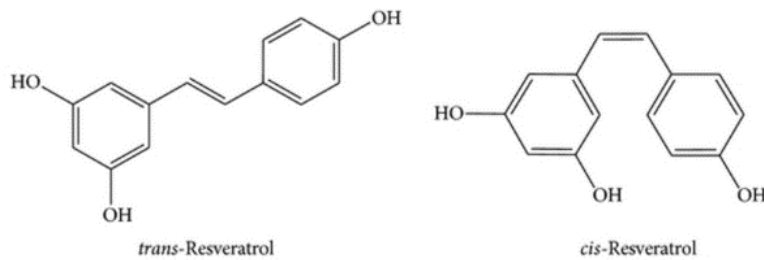
**Slika 2.** Kemijska struktura fenolnih kiselina (Ignat i sur., 2011)

### 3.1.2. Stilbeni

Osim fenolnih kiselina postoji još jedna skupina neflavonoida, a to su stilbeni.

Resveratrol, derivat stilbena, se smatra za važnu biološku komponentu vina (Haseeb i sur., 2015). Postoji i kao *cis*- i kao *trans*- izomer, a u prirodi se češće može naći u *trans*- obliku.

Pokazuje široki raspon biološkog djelovanja kao što su antioksidativna i antimikrobna svojstva. Grožđe loze *Vitis vinifera* te posebice crno vino predstavljaju njegov glavni izvor u ljudskoj prehrani. Koštice grožđa sadrže od oko 0,5 do 2,0 mg resveratrola po g suhe težine dok prosječna koncentracija u crnim vinima varira između 1,0 i 3,0 mg po litri (Melzoch i sur., 2001), a količina resveratrola u kožici grožđa varira ovisno o sorti grožđa, zemljopisnom podrijetlu te izloženosti gljivičnoj infekciji.



**Slika 3.** Kemijske strukture *cis*- i *trans*- resveratrola

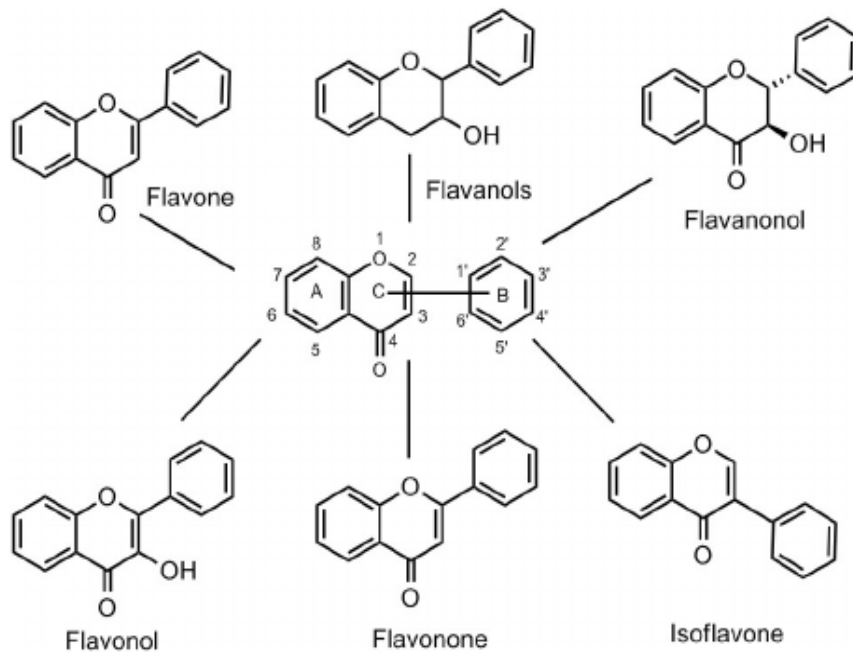
### 3.2.Flavonoidi

Flavonoidi su skupina polifenolnih spojeva koji se nalaze u sjemenkama, kori ili lišću mnogih biljaka, a u grožđu su sadržani u pokožici, sjemenkama i peteljci. Imaju izražena antioksidacijska svojstva te sposobnost sparivanja elektrona slobodnih radikala, a pojavljuju se kao glikozidi, aglikoni i metilirani derivati. Osnovna kemijska struktura flavonoida sastoji se od 15 ugljikovih atoma povezanih u obliku C6-C3-C6, difenolpropan (Balasundram i sur., 2006). Ovisno o broju i položaju hidroksilnih skupina, stupnju nezasićenosti i oksidacije centralnog ugljikovog prstena dijele se na flavane, flavone i antocijanidine. U grupu flavonoida spadaju i umreženi i polimerizirani flavonoidi, tj. tanini.

Flavonoidi imaju zaštitnu ulogu u biološkim sustavima jer osim sparivanja elektrona slobodnih radikala, inhibiraju oksidaze, aktiviraju antioksidacijske enzime te kelatno vežu ione prijelaznih metala ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ). Poznato je da ovi metali djeluju kao katalizatori oksidacijskih reakcija i promotori nekih enzima (Bimpilas i sur., 2015). Imaju važan utjecaj na stabilnost, boju i bistrinu vina te utječu na organoleptička svojstva.

Grožđe i vino sadrže velike količine fenolnih spojeva, uglavnom flavonoida, a također su i ostaci proizvodnje vina karakterizirani velikom količinom fenolnih spojeva zbog nepotpunog vađenja u procesu proizvodnje. Koncentracija ukupnih fenola u bijelom vinu iznosi prosječno 500 mg/L, dok je kod crnih vina puno veća, 5500 mg/L. Ekstrakcija dosegne oko 30-40% ovisno o sorti grožđa, lokaciji vinograda te parametrima za proizvodnju kao što su temperatura, uporaba enzima, drobljenje, maceracija i prešanje (Elkahoui i sur., 2018). Nusproizvodi poput sjemenke

ili komine predstavljaju jeftin izvor za ekstrakciju antioksidansa koji se mogu dalje upotrijebiti kao dodaci prehrani ili u proizvodnji fitokemikalija (Rockenbach i sur., 2011).



**Slika 4.** Kemijska struktura flavonoida (Banjarnahor i Anartanti, 2014)

### 3.2.1. Flavani

U grupu flavana spadaju flavan, flavan-3-ol te flavanon.

Najšira grupa flavonoida su flavan-3-oli koji su derivati flavana, a koriste kostur 2-fenil-3,4-dihidro-2H-kromen-3-ol. Neutraliziraju slobodne radikale te smanjuju rizik od raka, a nalaze se u sjemenkama grožđa, kako zrnu, čaju i određenom voću. U skupinu flavan-3-ola ubrajaju se katehin, epikatehin, galokatehin te epigalokatehin. Katehin i epikatehin su izomeri, a svaki od njih može biti prisutan u dva enantiomerna oblika što rezultira postojanjem četiri različita monomerna flavanola: (-)-epikatehin, (+)-epikatehin, (-)-katehin, (+)-katehin (Ottaviani i sur., 2011).

Katehini se ubrajaju u flavanole koji imaju gorka svojstva i daju trpkost vinu, a ekstrahiraju se tijekom alkoholnog vrenja. Ne opisuju se kao tanini jer ne talože proteine, a najvećim dijelom su smješteni u bobicama i sjemenkama peteljke (Alpeza, 2008).

Flavonone karakterizira odsutnost nezasićene veze na C2 atomu te prisutnost kisika na C4, a uglavnom su glikolizirani disaharidom u C7 atomu. Pretežno su prisutni u citrusnom voću, a u manjim količinama prisutni su i u koncentriranim rajčicama.



**Slika 5.** Kemijska struktura stereoizomera flavanola (Ottaviani i sur., 2011)

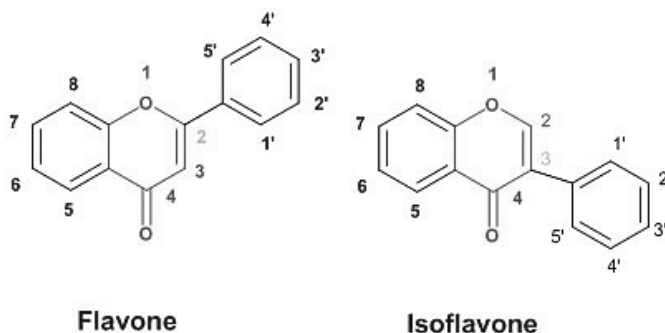
### 3.2.2. Flavoni

U grupu flavona spadaju flavon, flavonol i izoflavon.

Flavoni su pigmenti slični antocijanima koji imaju antioksidativno i antiupalno djelovanje, a daju svijetložutu boju voću i povrću.

Flavonima su po strukturi slični flavonoli, razlikuju se jedino u hidroksilnoj skupini na C3 atomu, a istraživanja su pokazala kako je razina flavonola u bijelim vinima znatno niža nego u crnim vinima jer su flavonoli pretežito sadržani u kožici grožđa koja se najčešće ne koristi u proizvodnji bijelog vina. Najpoznatiji aglikoni među njima su miricetin, kvercetin, kempferol i izoramnetin (Jeffery i sur., 2008). Topljivost flavonola u vodi je manja nego topljivost antocijana pa se za njihovu ekstrakciju pojačava količina etanola tijekom alkoholne fermentacije (Bimpilas i sur., 2015).

Izoflavoni se strukturno razlikuju od ostalih flavonoida po tome što je kod njih B prsten vezan za C3, a ne C2 atom. Nalaze se u mahunarkama, a zajedno s lignanima čine skupinu fitoestrogena jer imaju strukturu sličnu strukturi estrogena (Ignat i sur., 2011).

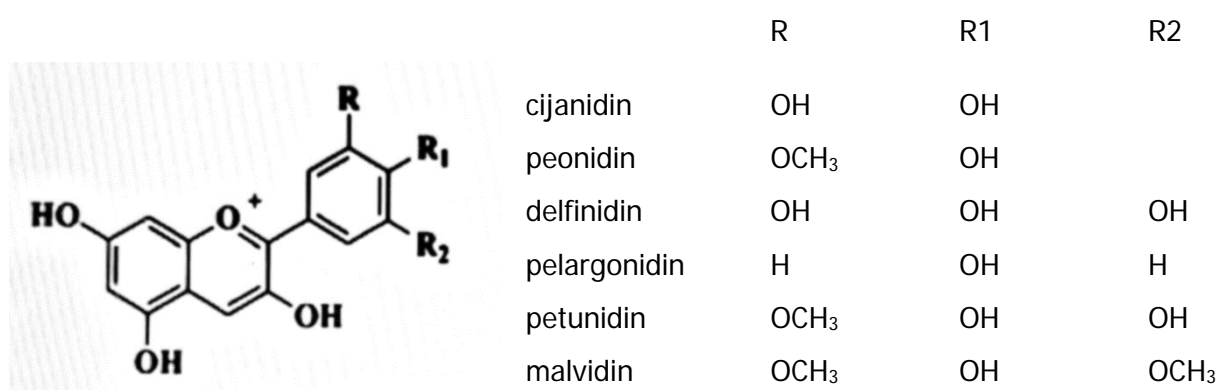


**Slika 6.** Kemijska struktura flavona i izoflavona (Kshatriya i sur., 2013)

### 3.2.3. Antocijanidini

Antocijanidini su pigmenti topivi u vodi ili staničnom soku koji daju boje od ružičaste do ljubičaste i plave ovisno o pH vrijednosti. Najpoznatiji antocijanidini su pelargonidin, cijanidin, delfinidin, peonidin, petunidin te malvidin. U prirodi se nalaze u glikozidnoj strukturi u obliku antocijana koje tvore antocijanidini, tj. aglikon i šećer, odnosno glikon. Šećeri koji se obično povezuju s antocijanidinima su monosaharidi (glukoza, galaktoza, ramnoza i arabinoza) i di- i tri- saharidi nastali kombinacijom ovih monosaharida (Ignat i sur., 2011).

Nositelji crvene boje grožđa i vina su upravo antocijani koji su smješteni u koži bobice, dok vrlo mala količina nalazi i u sjemenkama. Međutim, zbog brojnih reakcija s polifenolima u koje antocijani ulaze, dozrijevanjem vina njihova koncentracija opada (Alpeza, 2008). Tako tijekom 10-15 godina količina antocijana u vinu iznosi svega 10% početne količine. U 1 kg grožđa pojedine sorte sadrže sljedeće količine antocijana: Granache 100 mg, Borgonja 500 mg, Teran 550 mg, Merlot 600 mg, Plavac mali 700 mg, Cabernet Sauvignon 800 mg, Syrah 2000 mg.



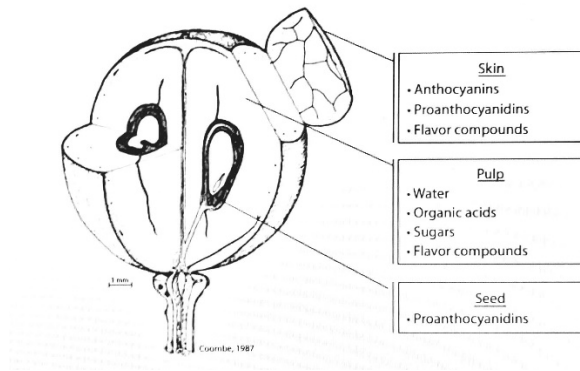
**Slika 7.** Kemijska struktura antocijanidina (Garrido i Borges, 2013)

### 3.2.4. Tanini

Tanini su umreženi i polimerizirani flavonoidi građeni od katehina, leukoantocijana, proantocijana i hidroksikiselina. Oni su nosioci trpkog i gorkog okusa te talože bjelančevine. Kondenzirani tanini ili proantocijanidini sastoje se od flavanolskih jedinica kojih može biti i do 17 u jednoj molekuli, a za ljudsku prehranu najvažniji su procijanidini koji se sastoje od monomera (+)-katehina i (-)-epikatehina ranije spomenutih u radu. U grožđu najviše tanina sadrži sjemenka 3-15%, kožica 4,5 %, meso 0,6-2% te peteljka 3-7%.

Kako se starenjem vina količina antocijana smanjuje, ulogu pružanja boje u starim crnim vinima preuzimaju upravo tanini koji se u većim količinama nalaze u crnim nego u bijelim

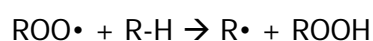
vinima. S obzirom na to da bijela vina sadrže manje tanina i fenola, njihov prirodni konzervans je kiselost.



**Slika 8.** Presjek bobice grožđa s komponentama bitnim za kvalitetu vina (Kennedy, 2008)

#### 4. Antioksidansi u vinu

Antioksidansi su tvari koje sprječavaju oksidaciju koja uzrokuje promjenu boje, mirisa i okusa vina. Oni stabiliziraju ravnotežu nesparenih elektrona i neutraliziraju potencijalno štetno djelovanje slobodnih radikala, a da pri tome sami ne postanu nestabilni. Djeluju tako da onemogućuju stvaranje novih slobodnih radikala u organizmu, uništavaju već stvorene radikale u organizmu te popravljaju oštećenja u stanici nastala djelovanjem radikala. Povećana količina slobodnih radikala dovodi do oksidativnog stresa zbog čega nastaju oksidativna oštećenja, smrt stanica, oštećenja tkiva i razne bolesti. Mehanizam djelovanja slobodnih radikala može se podijeliti u tri koraka: inicijacija, propaganacijski ciklus te terminacija (Milat, 2019). Slobodni radikal koji je nestabilan jer ima manjak elektrona u vanjskoj ljusci „napada“ najbližu stabilnu molekulu te preuzima njezin slobodni elektron. Stabilna molekula se destabilizira te postaje slobodni radikal, a reakcija postaje lančana što kao rezultat ima stvaranje sve većeg broja slobodnog radikala koji oštećuju stanice.





Najznačajniji antioksidansi grožđa i vina su fenolne komponente koja vino čine ljekovitim, ali također imaju utjecaj i na njegova organoleptička svojstva. Antioksidacijska svojstva fenolnih spojeva su važna kod određivanja njihove zaštitne uloge protiv slobodnih radikala, a zaštitna uloga polifenola u biološkim sustavima pripisuje se njihovoj sposobnosti sparivanja elektrona slobodnog radikala što se još naziva i antiradikalna aktivnost.

Istraživanja su pokazala kako je antioksidativnost jedne čaše crnog vina (150 ml) jednaka antioksidativnoj aktivnosti 12 čaša bijelog vina (Kesić i sur., 2015.).

## **5. Ekstrakcija polifenola**

Ekstrakcija je tehnološka operacija potpunog ili djelomičnog odjeljivanja smjese tvari koje imaju nejednaku topivost u različitim otapalima, a kako bi ekstrakcija bila što uspješnija potrebno je odrediti optimalne uvjete te pažljivo izabrati otapala koja će se koristiti kako ne bi došlo do narušavanja kemijskog sastava (Cheng i sur., 2012). Već više desetljeća koriste se tradicionalne tehnike poput ekstrakcije po Soxhletu ili ekstrakcija kruto-tekuće, no zbog dugotrajnosti i velike potrošnje otapala sve se više koriste novije tehnologije ekstrakcije potpomognute visokim tlakom, mikrovalovima i superkričnim CO<sub>2</sub>. Važni parametri za optimiziranje troškova energije i procesa su temperatura i vrijeme, a bitan faktor je i pH vrijednost.

Fenolne komponente su različito raspodijeljene unutar grožđa pa se ekstrakcija može vršiti iz cijele pulpe, kožice ili sjemenke, a kao što je već navedeno ranije u radu polifenolima je najbogatije sjeme (Nawaz i sur., 2006).

## **6. Metode za analizu i određivanje polifenola u vinu**

Kao što je već navedeno ranije u radu, postoji niz metoda kojima se mogu analizirati komponente sadržane u vinu, a koja će se tehnika koristiti ovisi o skupinama polifenola koje se žele istražiti, o svrsi istraživanja te o opremljenosti laboratorija.

### **6.1. Tankoslojna kromatografija (TLC)**

Za kvalitativnu i kvantitativnu analizu te za određivanje sposobnosti hvatanja slobodnih radikala koristi se tankoslojna kromatografija (TLC), a najčešće se upotrebljavaju TLC ploče presvučene slojem silikagela. Detekcija se provodi u područjima valnih duljina 250-260 nm i 350-365 nm obzirom da polifenoli apsorbiraju u ultraljubičastom dijelu spektra. Kvantitativna

analiza uzoraka tankoslojnom kromatografijom u današnje vrijeme najčešće se provodi denzitometrom, uređajem koji zrakom svjetla pretražuje tanki sloj uzorka radi mjerenja UV apsorpcije (Rastija i Medić-Šarić, 2009).

## **6.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)**

Najširu primjenu u analizi polifenola iz vina ima tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), a važno je pažljivo izabrati kolone, pokretne faze te način eluiranja koji prvenstveno ovisi o sastavu vina. Najčešće se koristi gradijentna elucija uz upotrebu jednog polarnog i jednog manje polarnog otapala. Pri uzorcima s malim koncentracijama polifenola potrebno je koristiti detektor s nizom dioda radi povećanja osjetljivosti i selektivnosti. Razlikovanje fluorescirajućih i nefluorescirajućih komponenti omogućava se korištenjem fluorescencijskog detektora serijski spojenog s apsorpcijskim UV-Vis detektorom. Za termički nestabilne ili slabo hlapljive komponente koristi se ionizacijska tehnika elektroraspršenjem kojom se povezuju tekućinska kromatografija i masena spektrometrija, a osim elektroraspršenja primjenjuje se i matricom potpomognuta desorpcija i ionizacija laserskim zračenjem (MALDI) (Rastija i Medić-Šarić, 2009).

UV-Vis metoda ima ograničenu upotrebu zbog velike molekulske mase polifenola.



**Slika 9.** HPLC kromatogrami ekstrakta crnog vina dobiveni uporabom UV detektora (A) i fluorescencijskog detektora (B) (Rastija i Medić-Šarić, 2009)

## **6.3. Gel-propusna kromatografija**

Gel-propusna kromatografija je vrsta kromatografije isključenjem po veličini koja se primjenjuje za frakcijsko razdvajanje polifenolnih supstanci iz crnih vina prije analize tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti uz masenu spektrometriju. Ovom

metodom se može procijeniti prosječna masa zbog mogućnosti taloženja pojedinih komponenti.

#### **6.4. Plinska kromatografija (GC)**

Analitičke metode poput plinske kromatografije povezane s masenom spektrometrijom razvijene su za karakterizaciju i kvantifikaciju fenolnih spojeva u vinu koje zahtijevaju derivatizaciju hlapivih spojeva i detekciju masenom spektrometrijom u selektivnom načinu praćenja iona (Medić-Šarić, 2013).

Osim za analizu hlapivih komponenti vina kao što su terpeni, plinskom kromatografijom se uz derivatizaciju analita mogu detektirati i polifenolni sastojci (Rastija i Medić-Šarić, 2009).

### **7. Čimbenici koji utječu na polifenolni sastav vina**

Sadržaj polifenola u vinu uvjetovan je vrstom grožđa što spada pod unutarnji faktor te vanjskim faktorima kao što su atmosferski uvjeti, geografski položaj, tehnike u vinifikaciji te brojni drugi procesi vezani za vinogradarstvo. Također na količinu i sastav polifenola u vinu utječu i potencijalne bolesti te tretiranje vina fungicidima. Zbog jedinstvene genetske raznolikosti, sorte grožđa razlikuju se i po fenolnom sastavu što je razlog neizbježne detaljne analize grožđa nekom od ranije navedenih metoda što bi dovelo do izbora najkvalitetnije sorte i postupaka proizvodnje za pojedinu vrstu vina.

Važan čimbenik je kvaliteta grožđa, vino proizvedeno iz kvalitetnijeg grožđa karakterizirano je većom količinom polifenola ekstrahiranom iz kože. Kvalitetno grožđe karakteristično je po manjim grozdovima s većim udjelom kože (Rastija i sur., 2016).

Što se tiče geografskog položaja bitno je spomenuti nadmorsku visinu. Kod grožđa iz vinograda koji su se nalazili na višim nadmorskim visinama utvrđeno je postojanje veće količine antocijanina, dok je kod grožđa iz vinograda s nižih nadmorskih visina utvrđeno postojanje veće količine procijanidina (Rastija i sur., 2016). Povećavanjem izlaganju svjetlu, posebice ultraljubičastim B zrakama, povećava se koncentracija flavonoida. Nadalje, prekomjerna ili neuravnotežena upotreba gnojiva može imati negativan utjecaj na polifenolni sadržaj, a dušična gnojiva, za razliku od kalijevih, smanjuju nakupljanje polifenola u koži grožđa (Rastija i sur., 2016).

Tehnike u proizvodnji vina kao što su maceracija, uvjeti fermentacije, dodavanje dodataka, itd. također utječu na sadržaj polifenola. Duljim trajanjem maceracije povećava se sadržaj katehina i proantocijanidina, a smanjuje količina antocijanina, osim toga količina katehina i

proantocijanidina se povećava i prisustvom stabljike tijekom fermentacije. Određena istraživanja su pokazala da su za razliku od vina proizvedenih alkoholnom fermentacijom, vina proizvedena maceracijom ugljikom imala su nižu koncentraciju polifenola, veću koncentraciju hlapivih komponenti te su bila manje intenzivne boje. Čimbenici koji također mogu utjecati su starenje i uvjeti skladištenja. Starenje u hrastovim bačvama omogućava ekstrakciju nekih benzojevih i cimetnih komponenti, galne kiseline, kumarina te nekih drugih u vino pa vina proizvedena fermentacijom te dozrijevanjem u hrastovim bačvama imaju različita organoleptička svojstva od onih koja su nakon fermentacije dozrijevala u bačvama od nehrđajućeg čelika (Medić-Šarić, 2013).

## 8. Utjecaj polifenola na zdravlje

Posljednjih godina istraživanja su pokazala kako polifenoli imaju pozitivan učinak na zdravlje organizama, pretežito zbog antioksidacijskog djelovanja te samim time štite od koronarnih bolesti i nastanka ateroskleroze. Osim toga dokazano je i njihovo antimikrobno, antiupalno i antikancerogeno djelovanje zbog čega se preporučuje redovita i umjerena konzumacija vina.

Resveratrol, koji je u vinu prisutan kao važna neflavonoidna komponenta, ima sposobnost inhibiranja LDL kolesterola te sprječava stvaranje krvnih ugrušaka tako što blokira nakupljanje trombocita u krvnim žilama (Rastija i sur., 2016).

Antimikrobno djelovanje crnog vina i kožice grožđa dokazano je protiv soja bakterija *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella infantis*, *Campylobacter coli*, *Helicobacter pylori* i *Listeria monocytogenes* te protiv gljivice *Candida albicans* (Rastija, 2011). Također, neka istraživanja su pokazala kako su ekstrakti koji sadrže fenolne kiseline aktivniji u djelovanju protiv bakterija nego protiv kvasaca što pokazuje kako su kvasci otporniji na ove komponente (García-Ruiz i sur., 2008).

Polifenoli inhibiraju prostaglandine koji tijekom upalnog procesa uzrokuju osjet boli, povišenje temperature i nastajanje edema te su jedni od obećavajućih antitumorskih prirodnih supstancija. Dokazano je da galna kiselina, katehin, *trans*-resveratrol i kvercetin inhibiraju karcinogenezu bilo da su eksperimenti rađeni *in vitro* na linijama stanica ili *in vivo* na životinjama ili ljudima oboljelim od zloćudnih tumora (Rastija i sur., 2016).

Polifenoli imaju i potencijal u poboljšanju neurološkog zdravlja, a posebice flavonoidi koji pokazuju djelotvornost na središnji živčani sustav tako što štite neurone od ozljeda uzrokovanih stresom, potiču bolje pamćenje i kognitivne funkcije (Kamenjašević i sur., 2017).

## 9. Zaključak

Vino i vinarski nusproizvodi su kvalitetan i jeftin izvor polifenola i brojnih drugih kemijskih spojeva koji po brojnim istraživanjima dokazano imaju povoljan učinak na organizam. Fenolni sastav ovisi o voćnom dijelu, dakle o samom grožđu, koži, sjemenu, listu i korijenskom tkivu. Kao što je već navedeno u radu, na fenolni sastav utječu i čimbenici kao što su klima, tlo, zrenje, branje te primijenjena metoda ekstrakcije.

Kako bi ekstrakcija polifenola bila uspješna i kako bi se dobio proizvod što bolje kvalitete potrebno je voditi računa o svim koracima tijekom proizvodnje, a posebice treba paziti da s berba odvija u optimalnom trenutku.

Sa što većim brojem provedenih istraživanja sve više se dokazuju pozitivni učinci polifenolnih spojeva iz vina kao što su antikancerogena, antimutagena, antimikrobna te antioksidativna djelovanja. Upravo se u polifenolima i drugim poželjnim komponentama u vinu nalazi objašnjenje pojma „francuski paradoks“ koji se odnosi na činjenicu da se kod Francuza bilježi manja stopa smrtnosti i oboljenja od kardiovaskularnih bolesti unatoč njihovoj prehrani koja se pretežno bazira na zasićenim masnim kiselinama. Važnu ulogu ima resveratrol koji inhibira oksidaciju LDL kolesterola i samim time sprječava stvaranje masnih naslaga u krvnim žilama.

## 10. Literatura

- Adams, D.O. (2006): Phenolics and ripening in grape berries. *American J. Enology and Viticulture* **57**: 249-256.
- Alpeza, I. (2008): Temelji kemijskog sastava vina. *Glasnik zaštite bilja* **31**: 143-150.
- Balasundram, N., Sundram, K. i Samman, S. (2006): Phenolic compounds in plants and agroindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* **99**: 191-203.
- Banjarnahor, S. D. S., Artanti, N. (2015): Antioxidant properties of flavonoids. *Medical Journal of Indonesia* **23**: 239-244.
- Bimpilas, A., Tsimogiannis, D., Balta-Brouma, K., Lympelopoulou, T., Oreopoulou, V. (2015): Evolution of phenolic compounds and metal content of wine during alcoholic fermentation and storage. *Food Chemistry* **178**: 164-1771.
- Budić-Leto, I., Lovrić, T. (2002): Identifikacija fenolnih kiselina i promjene njihovih udjela tijekom fermentacije i dozrijevanja bijelih vina Pošip i Rukatac. *Food Technology and Biotechnology* **40**: 221-225.
- Cheng, V. J., Bekhit, A. E.-D. A., McConnell, M., Mros, S., Zhao, J. (2012): Effect of extraction solvent, waste fraction and grape variety on the antimicrobial and antioxidant activities of extracts from wine residue from cool climate. *Food Chemistry* **134**: 474-482
- Elkahoui, S., Dao, L., Takeoka, G. (2018): Phenolic composition of grape pomace skin of four grape cultivars. *International Journal of Food Science and Nutrition* **3**: 246-249.
- Fontana, A.R., Antonioli, A., Bottini, R. (2013): Grape Pomace as a Sustainable Source of Bioactive Compounds: Extraction, Characterization, and Biotechnological Applications of Phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**: 8987–9003.
- García-Ruiz, A., Bartolomé, B., Martínez-Rodríguez, A. J., Pueyo, E., Martín-Álvarez, P. J., Moreno-Arribas, M. V. (2008): Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Food Control* **19**: 835-841.
- Garrido, J., Borges, F. (2013): Wine and grape polyphenols – A chemical perspective. *Food Research Interanational* **54**: 1844-1858.
- Haseeb, S., Alexander, B., Santi, R. L., Liprandi, A. S., Baranchuk, A. (2019): What's in Wine? A Clinician's Perspective. *Trends in Cardiovascular Medicine*, **29**:97-106

Ignat, I., Volf, I., Popa, V.I. (2011): A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry* **126**: 1821-1835.

Jagatić Korenika, A. M., Naletilić, I., Mihaljević Žulj, M., Puhelek, I., Jeromel, A. (2015): Utjecaj roka berbe i temperature maceracije na polifenolni sastav grožđa i vina sorte Frankovka (*Vitis vinifera* L.). *Glasnik Zaštite Bilja* **38**: 92-100.

Jeffery, D. W., Parker, M., Smith, P. A. (2008): Flavonol composition of Australian red and white wines determined by high-performance liquid chromatography. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **14**. 153-161.

Kamenjašević, M., Oršolić, N., Matković, A., Matković, B. R. (2017): Učinkovitost polifenolne prehrane na zdravlje i funkcionalnu sposobnost sportaša i rekreativaca. *Hrvatski Športskomedicinski Vjesnik* **32**: 5-12.

Katalinić, V., Generalić, I., Skroza, D., Ljubenkov, I., Teskera, A., Konta, I., Boban, M. (2009): Insight in the phenolic composition and antioxidative properties of *Vitis vinifera* leaves extracts. *Croatian journal of food science and technology* **1**: 7-15.

Kennedy, J.A., Saucier, C., Glories, Y. (2006) Grape and Wine Phenolics: History and Perspective. *American Journal of Enology and Viticulture* **57**: 239-242.

Kesić, A., Smajlović, B., Hodžić, Z., Ibrišimović-Mehmedinović, N. (2015): Utjecaj geografskog porijekla na antioksidacijsku aktivnost domaćih vina. *Hrana u zdravlju i bolesti, znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku* **4**: 93-97.

Kovačević Ganić, K. (2019): Osnove prehrambenih tehnologija: tehnologija vina. Nastavni materijal

Kshatriya, R. B., Shaik, Y. I., Nazeruddin, G. M. (2013): Synthesis Of Flavone Skeleton By Different Methods. *Oriental Journal of Chemistry* **29**: 1475-1487.

Kurtagić H. (2017): Polifenoli i flavonoidi u medu. *Hrana u zdravlju i bolesti, znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku* **6**: 28-35.

Ljevar, A., Ćurko, N., Tomašević, M., Radošević, K., Gaurina Srček, V., Kovačević Ganić, K. (2016): Phenolic Composition, Antioxidant Capacity and in vitro Cytotoxicity Assessment of Fruit Wines. *Food Technology and Biotechnology* **54**: 145-155.

Milat, A. M. (2019): Učinci bijelog vina na prirast tjelesne mase štakora te na in vitro antioksidacijsku i vazodilatacijsku aktivnost. Doktorska disertacija

Mulero, J., Martínez, G., Oliva, J., Cermeño, S., Cayuela, J. M., Zafrilla, P., Martínez-Cachá, A., Barba, A. (2015): Phenolic compounds and antioxidant activity of red wine made from grapes treated with different fungicides. *Food Chemistry* **180**: 25-31.

Nawaz, H., Shi, J., Mittal, G. S., Kakuda, Y. (2006): Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration. *Separation and Purification Technology* **48**: 176-181

Ottaviani, J. I., Momma, T. Y., Heiss, C., Kwik-Urbe, C., Schroeter, H., Keen, C. L. (2011): The stereochemical configuration of flavanols influences the level and metabolism of flavanols in humans and their biological activity in vivo. *Free Radical Biology & Medicine* **50**: 237-244.

Pichler, A., Pozderović, A., Prskalo, A., Andrašek, I., Kopjar, M. (2015): Utjecaj geografskih i klimatskih uvjeta na sadržaj tvari arome, polifenola i antocijana u crnim vinima erduskog vinogorja istočne Slavonije. *Glasnik Zaštite Bilja* **38**: 34-43.

Rastija, V., Medić-Šarić, M. (2009): Kromatografske analize polifenola u vinima. *Kemija u Industriji* **58**: 121-128.

Rockenbach, I.I., Gonzaga, L.V., Rizelio, V.M., Gonçalves,, A.E.S.S., Genovese, M.I., Fett, R. (2011): Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking. *Food Research International* **44**: 897-901.

Zakon o vinu (2019): *Narodne novine* 32 (NN 32/2019)



Izjava o  
izvornosti

*Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*

*Nina Macut*

---

ime i prezime studenta