

# Određivanje hlapivih spojeva odgovornih za negativne mirise vina

---

**Filipović-Grčić, Mirna**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2016**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:677044>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-15**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



AGRONOMSKI FAKULTET  
SVEUČILIŠTA U ZAGREBU

**ODREĐIVANJE HLAPIVIH SPOJEVA  
ODGOVORNIH ZA NEGATIVNE MIRISE  
VINA**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2016

AGRONOMSKI FAKULTET  
SVEUČILIŠTA U ZAGREBU

Agroekologija – Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi

MIRNA FILIPOVIĆ-GRČIĆ

**ODREĐIVANJE HLAPIVIH SPOJEVA  
ODGOVORNIH ZA NEGATIVNE MIRISE  
VINA**

DIPLOMSKI RAD

Mentor: doc.dr.sc. Leo Gracin

Zagreb, 2016

Ovaj diplomski rad je ocijenjen i obranjen dana \_\_\_\_\_

s ocjenom \_\_\_\_\_ pred Povjerenstvom u sastavu:

1. Doc.dr.sc. Leo Gracin \_\_\_\_\_

2. Prof. dr. sc. Ana Jeromel \_\_\_\_\_

3. Prof. dr. sc. Edi Maletić \_\_\_\_\_

*Zahvaljujem se svom mentoru doc.dr.sc. Leu Gracinu na nesebičnoj pomoći i velikom trudu. Hvala na stručnim savjetima prilikom izrade ovog rada.*

*Zahvaljujem se svim djelatnicima Zavoda za vinogradarstvo i vinarstvo, Hrvatskog centra za poljoprivredu, hranu i selo za stručne savjete, poticaje te susretljivost koja se danas rijetko susreće, a posebno mr.sc. Renati Leder rukovoditeljici Odjela za kontrolu kvalitete proizvoda.*

*Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji za stalni poticaj, strpljenje i podršku koju su mi pružali tijekom izrade ovog rada i cjelokupnog školovanja.*

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Najvažnija svojstva i porijeklo negativnih hlapivih spojeva vina.....	3
1.1.1. 2,4,6 trikloranisol (TCA), 2,4,6 tribromanisol (TBA).....	4
1.1.1. Geosmin.....	6
1.1.2. 4 - etil fenol, 4 - etil guaiakol, 4 - vinil fenol .....	8
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	11
3. RAZVOJ GC/MS METODE .....	12
3.1. Masena spektrometrija (MS) .....	13
3.1.1. Ionska zamka spektrometrije masa vs. kvadrupolni analizator mase .....	14
4. MATERIJALI I METODE .....	15
4.1. Kemikalije.....	15
4.2. Instrumenti i pribor .....	15
4.3. Uzorci .....	17
4.4. Razvoj GC/MS metode.....	18
4.4.1. Kalibracija metode.....	23
4.4.2. Priprema uzoraka za analizu.....	24
4.4.3. Identifikacija i kvantifikacija (MS parametri) .....	25
4.4.4. Kromatografski uvjeti.....	25
5. REZULTATI I RASPRAVA .....	26
5.1. Razvoj GC-MS metode.....	26
6. ZAKLJUČAK .....	29
7. DODACI .....	30
7.1. Prilozi.....	30
7.2. Rezultati analize fizikalno kemijskih parametara u vinu .....	33
7.2. Popis slika.....	34
7.3. Popis tablica.....	34
8. POPIS LITERATURE .....	35
9. ŽIVOTOPIS .....	39

## SAŽETAK

Veliki broj vina, kako crnih tako i bijelih, sadrže različite hlapive spojeve koji imaju izrazito niske osjetilne pragove. Predmet istraživanja ovog diplomskog rada bili su hlapivi spojevi koji su odgovorni za negativne mirise vina. U skupini predmetnih spojeva nalaze se: 2,4,6 trikloranisol, 2,4,6 tribromanisol, geosmin, 4 etil fenol, 4 etil guaiakol i 4 vinil fenol. S tim ciljem razvijena je metoda za analizu istih koji imaju negativan utjecaj na miris vina, te je ustanovljena prisutnost ovih spojeva u 40 vina hrvatskih proizvođača od čega 30 crnih i 10 bijelih. Razvijena metoda je kvantitativna plinska kromatografska metoda unutarnjeg standarda uz SPME (mikroekstrakciju na čvrstoj fazi) kao pripremu uzorka te uz detekciju na masenom detektoru. Modifikacijom i doradom razvijene metode ista bi se mogla koristiti pri daljnjim analizama i detekciji navedenih kontaminanata kako bi se u budućnosti smanjila njihova prisutnost u vinu. Upotrebom masenog detektora boljih karakteristika (kvadrupolni analizator mase) bi se prag detekcije i kvantifikacije mogao poboljšati.

**Ključne riječi:** vino; negativni mirisi; mikroekstrakcija na čvrstoj fazi; GC/MS

## ABSTRACT

### **Determination of negative „off flavors“ in wine.**

Volatile compounds with low olfactory threshold are highly important for wine quality. The subject of this graduated thesis was determination of volatile compounds responsible for negative flavours in wine. Compounds of interest are: 2,4,6-trichloroanisole, 2,4,6-tribromoanisole, geosmin, 4-ethylphenol, 4-ethylguaiacol and 4-vinylphenol. SPME-GC-MS method was developed for analysing these compounds and they were identified in 40 samples of wines produced by Croatian winemakers, 30 red and 10 white. The developed method was quantitative gas chromatography internal standard method with the sample preparation using SPME (solid phase microextraction) and detection using mass detector. Further modification and development of this method, such as use of more powerful mass detector (quadrupole), which would improve limits of detection and quantification, could help detecting these undesirable compounds and limiting their presence in wine.

**Keywords:** Wine; Off-flavours; SPME; GC-MS

## 1. UVOD

Vino je jedini prirodni napitak koji posjeduje kompleksni spektar aroma, mirisa i okusa. Pod pojmom aroma najčešće se misli na kombinaciju primarnog i sekundarnog mirisa vina. Primarna aroma vina zavisi isključivo od kultivara od kojeg se proizvodi vino. Sekundarna aroma nastaje u tijeku proizvodnog procesa gdje kvasci imaju veoma važnu ulogu, ali pored njih kod sekundarne arome mogu biti važni i drugi čimbenici poput bačve u kojoj vino odležava. Postoji i tercijarna najsuptilnija aroma koja nastaje starenjem i odležavanjem vina, a naziva se buke (Web 4).

Miris vina ima veliki značaj za kvalitetu konačnog proizvoda i od velike je važnosti za uspjeh vina na tržištu. Tijekom proizvodnje grožđa i uslijed neadekvatnih uvjeta prerade grožđa, dozrijevanja i čuvanja vina može doći do nastajanja spojeva koji imaju negativan utjecaj na miris vina. Glavne organoleptičke mane vina uključuju molekule koje imaju pragove percepcije koje se kreću od 100 mg/L za neke spojeve do koncentracije u ng/L za npr. 2,4,6 trikloranisol (Boutou, Chatonnet, 2007).

Bolesti vina su štetne promjene kemijskih i organoleptičkih svojstava vina, a često su uzrokovane mikroorganizmima. Najčešće su to promjene vanjskog izgleda, boje, bistroće, mirisa i okusa. Mikroorganizmi (kvasci, bakterije i plijesni) metaboliziraju određene spojeve prisutne u vinu, a njihovim promjenama nastaju kemijski spojevi koji loše utječu na kvalitetu vina. Do bolesti vina dolazi inficiranjem štetnim mikroorganizmima u tijeku prerade grožđa, vinifikacije i dozrijevanja vina. Stoga je higijena podrumskih prostora i posuda te svih pomagala u podrumima jedina i najvažnija mjera u sprječavanju nastajanja bolesti vina. Neki mikroorganizmi nalaze se i u zaraženom (bolesnom) grožđu, stoga bi se takvo grožđe trebalo odvojeno prerađivati i voditi računa da je i takvo grožđe i vino „zarazno“, te ne dozvoliti da dođe u kontakt sa zdravim grožđem ili vinom (Rendulić i sur., 2010).



Siva plijesan vinove loze (*Botrytis cinerea*), bolest koja se pojavljuje naročito pred berbu, izazivajući sivu trulež čitavih grozdova. Jedan je od najčešćih čimbenika koji utječu na lošiju kvalitetu vina. Na zaraženim bobicama pojavljuju se najprije smeđe pjege koje se povećavaju i zahvaćaju cijelu površinu bobice. Ukoliko je vrijeme suho, tada se takve bobice smežuraju i suše. Međutim, ako je vrijeme vlažno s mnogo oborina, na bobicama se pojavljuje pepeljasto siva navlaka, koja predstavlja konidiofore s konidijama koje šire zarazu s bobice na bobicu. Poznata je kao saprofit na različitim mrtvim i odumirajućim biljnim dijelovima a kao parazit dolazi na različite biljke i biljne organe (izbojke, listove, plodove itd.) (Web 13).



Slika 1. *Botrytis cinerea* na grozdu

Izvor : (Web 12)

Utjecaj truleži grožđa na organoleptičke mane grožđa, a samim time i vina kao konačnog proizvoda može biti uzrokovano od hlapivih spojeva poput geosmina i 2 – metilisoborneola odgovornih za zemljani i pljesnivi miris koji su identificirani pomoću plinske kromatografije i olfaktometrijski u organskim ekstraktima trulog grožđa i mošta (La Guerche i sur., 2006).

Samo organoleptičko ispitivanje vina u mnogim slučajevima nije dovoljno kako bi se odredio točan uzrok. Zbog toga suvremena analitika sve više dobiva na važnosti kod otkrivanja neželjenih aroma i njihovih spojeva. Aroma tipična za pojedinu sortu sastoji se od relativno malog broja spojeva koji nastaju u dozrelim bobicama grožđa u malim koncentracijama koje prema literaturi iznose u ppb(part per billion) = mikrogram po litri ( $\mu\text{g/L}$ ) ili ppt (part per trillion) = nanogram po litri ( $\text{ng/l}$ ). Podizanjem standarda proizvodnje vina i analize vina tijekom dozrijevanja može smanjiti njihovo prisustvo (Web 1)

## 1.1. Najvažnija svojstva i porijeklo negativnih hlapivih spojeva vina

Bolesti i mane ponekad je moguće privremeno spriječiti, ali ih nije moguće u potpunosti ukloniti. Upravo zbog toga redovita provjera i njega prerađenog grožđa, posuđa i podruma može na vrijeme spriječiti daljnji razvoj novonastale bolesti i mane. Svaka bolest i mana ima drugačiji utjecaj na vino, neke se lako uklone, a neke mogu promijeniti vino toliko da postane neupotrebljivo za konzumaciju. Predstavnici te skupine spojeva su 2,4,6 trikloranisol (TCA) i 2,4,6 tribromanisol (TBA). Njihovo pojavljivanje u vinu se najčešće povezuje s upotrebom prirodnih plutenih čepova iako se mogu pojaviti i tijekom proizvodnje vina uslijed djelovanja različitih plijesni i bakterija u podrumu (Varaždinac, 2015).

Koncentracije hlapivih spojeva do sad istraženih u radovima. Kao i njihova vremena retencije i ostali parametri važni kod njihove identifikacije nalaze se u tablici 1.

Tablica 1. Ključni parametri kod određivanja hlapivih spojeva na GC/MS uređaju

Spojevi odgovorni za negativnu aromu vina	Optimalna temperatura za određivanje (°C)		Kvantifikacijski ion m/z	Kvalifikacijski ion m/z (%)	Vrijeme retencije (min)	Koncentracija (ng/L)		Limit detekcije (ng/L)	
2,4,6 – trikloranisol (TCA)	70 (6)		215 (6)	217 (6)	33,9 (6)	0,9 (5)		0,1 (6)	0,6 (3)
	40 (7)		195 (7)		28,2 (3)	2,6 (5)	20 (6)	0,95 (5)	0,3-0,5(7.)
						0,05-400 (7)		<0,5 (7)	
2,4,6 – tribromanisol (TBA)	46(6)		349(6)	347 (6)	44,6 (6)	1,9 (5)	0,1 (5)	0,2 (6)	0,7 (3)
					39,95 (3)	34,4 (5)	20 (6)	0,9 (6)	0,5 (7.)
Geosmin (GSM)	70 (6)		115 (6)	129 (12)	32,09 (3)	30 (6)	0,1-22,6 (6)	1 (6)	
	35 (7)		112(7)		39,55 (8)	2-400 (7)		1,5 (7)	
					34,4 (6)	5 (7)		<0,5 (7)	
4-etil fenol (4EF)	45-60 (6)		107,122 (10)	20,89 (3)				0,605, 0,368, 0,425 (11.)	7 µg/L (3)
4vinil fenol (4VF)			120(9)		57,21 (8)	36 mikrog/l(9)			
4 etil guaiakol(4EG)			137(9)						

\*(3) – (Boutou, Chatonnet, 2007); (5) – (Boutou i sur., 2004); (6) – (Sadoughi i sur., 2015); (7) – (Weingart i sur., 2010); (8) – (Lisanti i sur., 2014); (9) – (López i sur., 2002); (10) – (Cabrita, 2012); (11) - (La Guerche i sur., 2006)

Geosmin i 2-metilisoborneol (MIB) su spojevi koji vinu daje negativnu aromu na plijesan, a nastaju u pljesnivom grožđu prije samog procesa prerade grožđa ili tijekom proizvodnje. U mnogo slučajeva mane nastaju kao posljedica kompleksnog međudjelovanja kemijskih reakcija i mikrobiološke izmjene tvari. Takve reakcije su nerijetko vrlo komplicirane, što otežava uočavanje, sprječavanje i uklanjanje nedostataka nastalih u vinu (Web1).

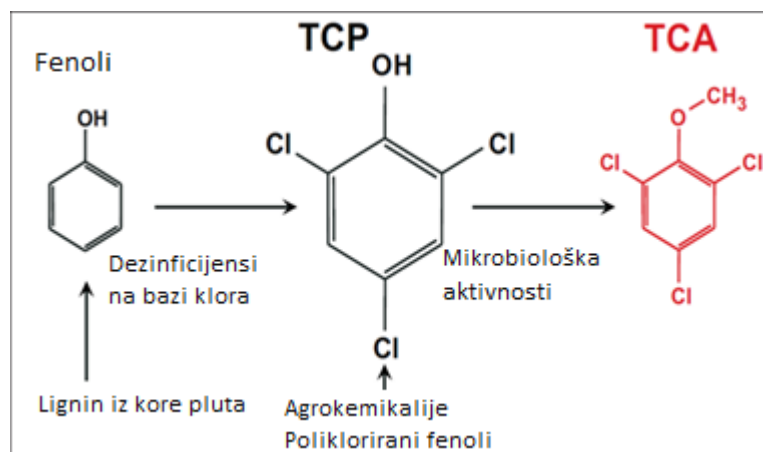
### **1.1.1. 2,4,6 trikloranisol (TCA), 2,4,6 tribromanisol (TBA)**

Benzene 1,3,5 trichloro – 2 methoxy ili 2,4,6 trikloranisol kemijske formule  $C_7H_5Cl_3O$ , spoj identificiran kao krivac za neugodan miris vina. Kloroanisoli, posebno 2,4,6-trikloranisol (TCA) i 2,3,4,6 tetrakloranisol (TeCA) su najčešće identificirani u vinima, a karakterističan je ustajao miris ili miris po „čepu“. Pretjerana uporaba dezinficijensa na bazi hipoklorita može dovesti do kontaminacije organskog materijala u kontaktu s vinom ili u podrumu nakon formiranja 2,4,6-triklorfenola.

TCA ima relativno niski mirisni prag detekcije u vodi 300 pg/L i 30 pg/L, dok se koncentracije u vinu ovisno o vrsti vina kreću između 1,5 i 3 ng/L (Boutou i sur., 2004). Limit detekcije za TCA iznosi oko 0,5-2 ng/L (Hayasaki i sur., 2005). Mirisni prag ovih spojeva u vinu nalazi se u koncentracijama od 3 ng/L (Boutou, Chatonnet, 2007). Tako niske koncentracije su teže za zamisliti, ali je analogna jednoj čajnoj žličici u par tisuća olimpijskih bazena ili jednoj sekundi u 32.000 godina (Web 14).

Kloroanisoli su već 1978. godine potvrđeni kao glavni kontaminanti kod pokvarenih vina korištenjem GC/MS metode. AWRI (Australian Wine Research Institute) je otkrio da su različiti uzroci klorofenolnog zagađenja vina poput kloriranih dezinficijensa (Hayasaka, 2005). Takva vrsta negativnog mirisa može utjecati i na lošu reputaciju samih proizvođača koji mogu imati velikih financijskih problema zbog pojave TCA u vinu. Stoga je iznimno važno razumjeti i pratiti kemijsku pozadinu negativnih spojeva tijekom kontrole kako plutenih čepova koji se koriste kod ambalažiranja vina tako i samog vina.

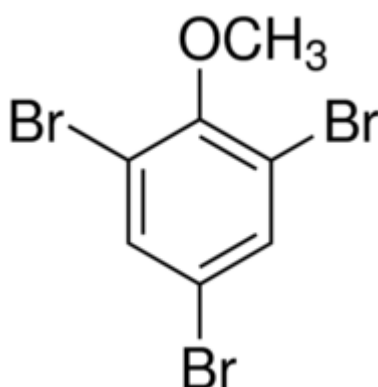
Međutim, kako istraživanja potvrđuju da TCA prisutan u vinu može nastati iz pluta, ali i pod utjecajem drugih faktora kao što su prijevoz, skladištenje i rukovanje također mogu povećati koncentraciju TCA u konačnom proizvodu (Alzaga i sur., 2003).



Slika 2. Proces nastanka 2,4,6 trikloranisola

Izvor : (Web 14)

Pragovi percepcije, zajedno s uvjetima zagađenja tijekom proizvodnje vina, pohrane i starenja boca već su ranije proučavani te se došlo do zaključka da je "ustajao", pljesniv miris bio primjetan na miris u vinu pri koncentraciji od samo 4 ng/L TBA, a da se kvarenje može detektirati na još nižim koncentracijama (Chatonnet i sur., 2004).

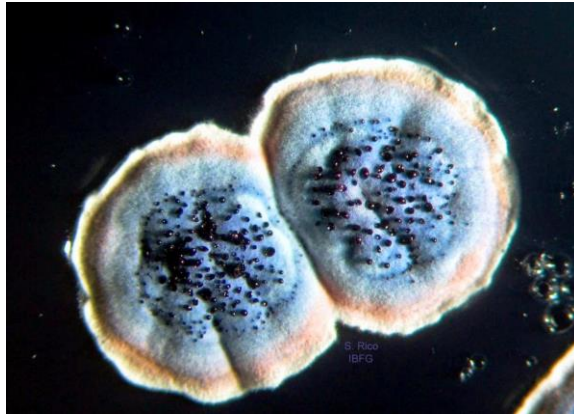


Slika 3. Strukturna formula 2,4,6 tribromanisola

Izvor : (Web 17)

### 1.1.1. Geosmin

Organski spoj kemijske formule  $C_{12}H_{22}O$ , koji vrsta aktinobakterije poznate kao *Streptomyces* otpušta nakon smrti naziva se geosmin. *Streptomyces*, rod vlaknastih gram-pozitivnih aerobnih bakterija složenog oblika porodice *Streptomycetaceae* (red *Actinomycetales*) uključuje više od 500 vrsta koje se javljaju u tlu i vodi (Web 6).



Slika 4. *Streptomyces coelicolor*

Izvor: (Web 7)

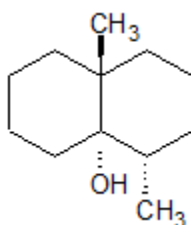
*Streptomyces* se koriste u području medicine, jer proizvode prirodne antibakterijske i antifungalne lijekove. Ljudski nos je posebno osjetljiv na ovaj miris, a možemo detektirati koncentracije niske kao 0,7 mikrograma po litri. Visoke koncentracije geosmina pronađene su u crnom i rose vinu te se navodi kako je geosmin relativno stabilan spoj i u kiselijim vinima. (Darriet i sur., 2000.)

Deve su navodno čak i osjetljivije na geosmin od ljudi, a to je jedan od razloga zašto su u mogućnosti pronaći vodu u pustinji i to na udaljenosti do 50 milja. Ove aktinobakterije vole vlažna područja, što omogućuje devama da slijede njihov miris prema vodi u najbližoj oazi. Aktinobakterije se pričvrste na životinju kako bi si osigurale transport do sljedeće oaze, a samim time i novo tlo za razmnožavanje (Web 3).

Geosmin daje karakterističan ali ponekad neželjeni "zemljani" okus na ciklu. Do danas se ne zna da li je geosmin nusprodukt metabolizma cikla ili ga sintetiziraju mikroorganizmi u tlu te ga cikla usvaja tijekom dozrijevanja. U jednom od istraživanja potvrđuje se teorija da je cikla sposobna endogeno sintetizirati geosmin (Lu i sur., 2003).

Ustajao, zemljani miris vrlo je štetan za kvalitetu vina, a posebno za njegov miris uz karakterističnu aromu svježe obrađene zemlje, vlažnog podruma u bijelim i crnim vinima različitog porijekla. Ekstrakcija i pročišćavanje vina sa sumnjom na miris geosmina pokazali su da nakon analize plinskom kromatografijom i olfaktometrijskim mjerenjem imaju jedinstvenu jaku smrdljivu zonu. Spoj odgovoran za ovaj miris identificiran je pomoću plinske kromatografije-masene spektrometrije kao geosmin (trans-1,10-dimetil-trans-9-decalol).

Geosmin može biti prisutan u vinima na razinama višim od percepcije mirisnog praga. Osim toga, prisutnost ovog spoja u soku preuzetom iz svježe zdrobljenog grožđa ukazuje na to da mikroorganizmi koji se razvijaju na grožđu mogu doprinijeti prisutnosti ovog spoja u vina (Darriet i sur., 2000).



Slika 5. Strukturna formula geosmina

[ (4S,4aS,8aR)-4,8a-dimethyloctahydronaphthalen-4a(2H)-ol].

Izvor : (Web 8)

Detalji biosinteze geosmina još u potpunosti nisu razjašnjeni, iako je otkriće enzima germakradienol sintaze svakako pomaže otkriti biokemijski put koji vodi do njega. Germakradienol sintaza vjerojatno katalizira ciklizaciju farnezil pirofosfata, koji je prekursor u biosintezi geosmina. Biosinteza geosmina počinje s farnezil difosfat(FPP), vrlo važan element u biosintezi sterola i seskuiterpena. Enzim germakradienol-geosmin sintaza (GGS) sadrži dvije vrlo slične katalitičke domene. Jedna domena pretvara FPP u germakradienol, koja difundira u drugoj domeni u blizini, a uključuje djelovanje najmanje tri enzima: ciklaze, A-reduktaze i hidroksilaze, gdje se pretvorba dovršava do geosmina (Web 9).

### 1.1.2. 4 - etil fenol, 4 - etil guaiakol, 4 - vinil fenol

Hlapivih fenoli, tj. 4-etil fenol (4-EF), 4-etil guaiakol (4-EG) i 4-vinil fenol (4-VF) su jedan od najznačajnijih problema u modernoj proizvodnji vina. Problematici su zato što mogu dati vinu negativan miris odnosno aromu, koji se opisuje kao medicinski, farmaceutski, miris na dim ili miris konjušnice (Boutou, Chatonnet, 2007).

4- etil fenol je para-supstituirani fenolni spoj kemijske formule  $C_8H_{10}O$ . Zbog potencijala *Brettanomyces* da uzrokuje kvarenje važno je razumjeti uvjete pod kojima se razvijaju 4-etil fenol i 4-etil guaiakol. Uključenost kvasaca u proces proizvodnje vina stekla je veću pozornost tijekom godina jer oni igraju ključnu ulogu u određivanju kvalitete vina. Kvasac roda *Brettanomyces* ili njegov teleomorf *Dekkera* su među mnogim koji se javljaju u prirodi (Botelho, 2013).

U istraživanju provedenom u dolini Okanagan u Kanadi na 188 vina koja su dozrijevala u bačvama utvrđeni su odgovarajući rasponi 4-EG 28-45  $\mu\text{g/L}$  i 1-437  $\mu\text{g/L}$  u vinima držanim u bocama (srednja vrijednost = 99  $\mu\text{g/L}$ ). Koncentracije 4-etil fenola i 4-etil guaiakola u prosjeku su bile 56  $\mu\text{g/L}$  i 29  $\mu\text{g/L}$ , uz > 97 do 99% vrijednosti ispod odgovarajućeg mirisnog praga za te spojeve (Rayne i sur., 2008).

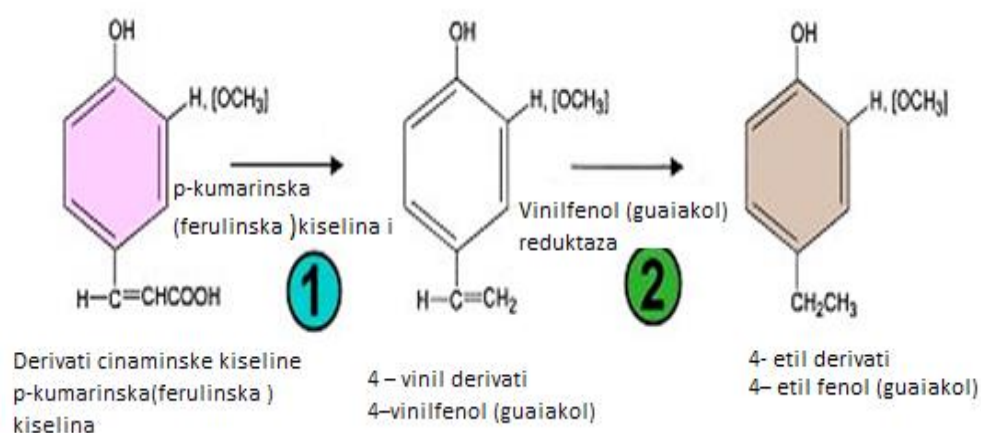


Slika 6. *Brettanomyces bruxellensis* u fermentaciji

Izvor : (Web 15)

Za razliku od 4EF, 4-etil guaiakol koji ima prilično ugodan miris dimljene slanine, začina ili klinčića, također spominje se i aroma trule vegetacije i plastike. *Brettanomyces* se vrlo često izolira na grožđu ali i na opremi u vinariji. Grube i neravne površine su idealne površine za rast i razvoj *Brettanomycesa*. Hrastove bačve i drugo porozno posuđe koje se koristi u vinarijama, teško se čiste i dezinficiraju. Iako metode čišćenja postaju sofisticirane (poput vodene pare i ionizacije), mikrostruktura hrastovih bačava pruža visok stupanj zaštite i osigurava okruženje u kojem *Brettanomyces* može opstati i biti prenesen iz vina u vino tijekom proizvodnje (Rayne i sur., 2008). Do rasta *Brettanomycesa* može doći ako su niske količina slobodnog sumpornog dioksida u kombinaciji s visokim pH vina te visokim temperaturama tijekom dozrijevanja vina.

Također smatra se da *Brettanomyces* ima sposobnost razmnožavanja nakon punjenja boca, pogotovo ako vino sadrži preostale fermentabilne šećere, takva fermentacija je puno češća situacija ako se vino slabo filtrira. Javlja se gotovo uglavnom u crnim vinima, crna vina za razliku od bijelih imaju mnogo veću razinu polifenola, kumarinske i ferulinske kiseline (Web 16).



Slika 7. Put nastanka 4-etil fenola i 4-etil guaiakola u vinu

Izvor : (Web 16)

Vinski kvasac *Saccharomyces* i neke bakterije mliječne kiseline, kao što su *Lactobacillus* imaju enzime koji razgrađuju kumarinsku i ferulinsku kiselinu do intermedijera 4-vinil fenola i 4-vinil guaiakola (korak 1 od slici 7). Ovi spojevi se zatim enzimatski razgrađuje *Brettanomyces* tijekom perioda od nekoliko mjeseci do jakog mirisa 4-etil-fenola i 4-etil guaiakola (Korak 2 na slici 7).



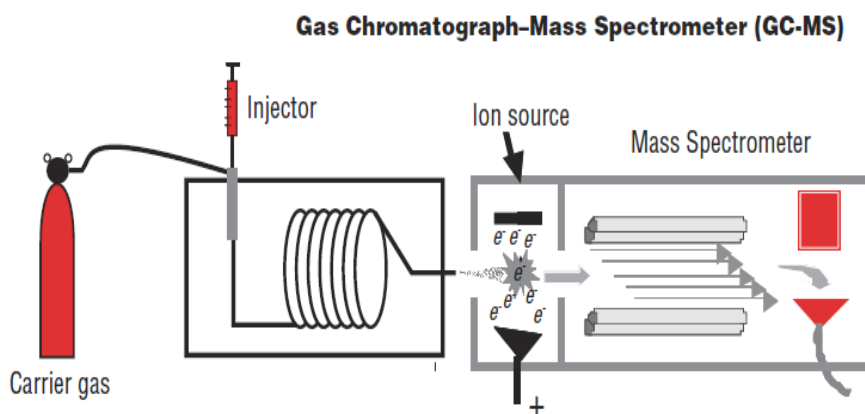
Senzorska procjena i analize pokazuju da senzorne percepcije praga 4-EF ovise o stilu i strukturi vina, odnosno koncentraciji i intenzitetu drugih spojeva u vinu koji bi ga mogli prikriti (npr. hlapivi hrastovi spojevi) ili naglasiti (npr. 4-EG). Navodi se da kvarenje uzrokovano *Brettanomycesom* obično javlja kada je vino skladišteno duže vrijeme ili kada fermentira u hrastovim bačvama. Za rast i razvoj treba mu koncentracija od samo 275 mg/L šećera da fermentira. Preostali šećer u suhom crnom vinu može se kretati između 420 i 1000 mg/L (Rayne i sur., 2008).

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj diplomskog rada je bio razviti metodu za analizu hlapivih spojeva odgovornih za negativne mirise vina, te ustanoviti prisutnost ovih spojeva u 40 vina hrvatskih proizvođača koji se nalaze na tržištu Republike Hrvatske. Razvijena i korištena metoda je kvantitativna plinsko kromatografska metoda unutarnjeg standarda uz SPME (mikroekstrakcija na čvrstoj fazi) kao pripremu uzorka te uz detekciju na masenom detektoru. Sličnim metodama se navedeni spojevi već analiziraju ali za metodu na konkretnom uređaju koji je na raspolaganju nije bilo dostupnih saznanja.

### 3. RAZVOJ GC/MS METODE

Kromatografska tehnika pogodna za analizu različitih hlapivih spojeva vina je plinska kromatografija sa masenim spektrometrom (GC/MS) kao detektorom. Plinska kromatografija sa spektrometrom masa (GC/MS) predstavlja „zlatni standard“ jer identificira prisutnost određene tvari u danom uzorku. Sastoji se od dvije glavne jedinice, plinskog kromatografa (GC) i spektrometra masa (MS). Razlike u kemijskim svojstvima između različitih molekula omogućuje razdvajanje molekula kako uzorak prolazi kolonu. Molekule trebaju različito retencijsko vrijeme ili vrijeme zadržavanja za izlazak (eluiranje) iz GC-a što MS-u omogućuje da uhvati tj. ionizira, zaokreće i detektira ionizirane molekule posebno. Spektrometar masa razdvaja svaku pojedinu molekulu u ionizirane fragmente i potom ih detektira koristeći omjer masa i naboja. Ovom metodom analiziraju se spojevi koje je moguće dovesti u plinovito stanje pri temperaturama nižim od 400 °C a da se pri tome ne raspadnu (Petrović, 2009). Shema plinskog kromatografa sa spektrometrom masa prikazana je na Slici 8.



Slika 8. Shematski prikaz GC/MS

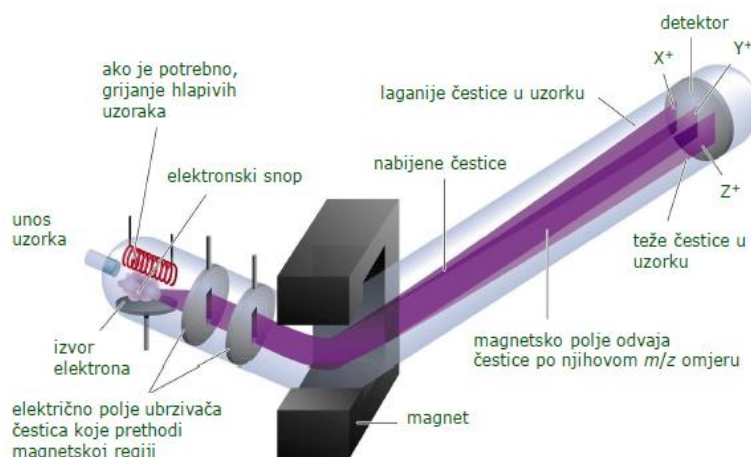
Izvor: (Hayasaka i sur., 2005)

### 3.1. Masena spektrometrija (MS)

Tehnika kojom se analiziraju molekule na temelju njihovih masa (i naboja). MS se koristi za: određivanje sastava nepoznatog uzorka (kvalitativna analiza)

- određivanje izotopskog sastava uzorka
- određivanje strukture molekula promatrajući fragmentaciju molekula
- određivanje količine neke tvari u uzorku (kvantitativna analiza)
- određivanje fizikalnih i kemijskih svojstava tvari (Djaković, 2015).

Maseni spektrometar je instrument koji generira ione iz molekula te mjeri njihovu masu. Osmišljen je kako bi učinio tri stvari: pretvorio neutralne atome ili molekule u pozitivne (ili rijetko negativne) iona, odvaja ione na temelju omjera njihove mase ( $m$ ) i naboja ( $z$ ), mjera relativne gustoće svakog iona.



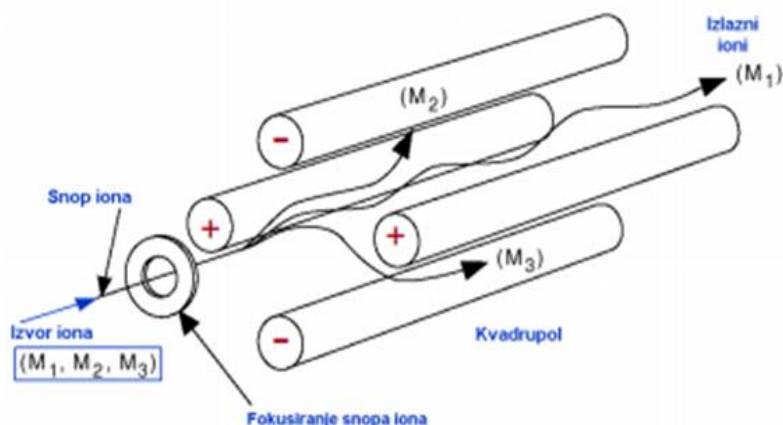
Slika 9. Princip rada masenog spektrometra

Izvor: (Djaković , 2015)

### 3.1.1. Ionska zamka spektrometrije masa vs. kvadrupolni analizator mase

Ionska zamka je mali dio s nekoliko elektroda koje su spojene s izmjeničnim i istosmjernim naponom. Ion koji uđe u zamku oscilira u zamci kompleksnim putanjama, koje se kontroliraju elektrodama s istosmjernim naponom. Ova metoda je brza i ima nisko razlučivanje. Kvadrupolni analizator mase čine četiri valjkaste paralelne elektrode. Ioni se propuštaju između četiri elektrode, a na elektrode je priključen izvor izmjenične struje. Kroz analizator mogu proći samo određeni ioni, a analiza se provodi mijenjanjem frekvencije napona.

Ionska zamka ima nekoliko glavnih prednosti u odnosu na kvadrupolni analizator mase. Bitna razlika kod detekcije iona je u tome da je ionska zamka čini više osjetljiva od kvadrupolnog analizatora. Kod kvadrupolnog se stabilizira samo jedna masa iona (Novak, Allegretti Živčić, 2013).



Slika 10. Kvadrupolni analizator mase

Izvor : (Novak, Allegretti Živčić, 2013)

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Kemikalije

U eksperimentalnom dijelu za pripremu koncentriranih i modelnih otopina za kalibraciju upotrijebljene su slijedeće kemikalije:

- Etanol C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, apsolutni, Mr=46,07, LOT: 1515509002 ,J.T.Baker, Nizozemska
- Etanol C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, apsolutni, Mr=46,07 ,J.T.Baker, SAD
- 4 – Ethylphenol, Mr = 122. 17, purum > 97% GC, Fluka, Japan.
- 4 – Ethylguaiacol, ≥98%, FCC, FG. CAS Number 2785-89-9, W243604 Aldrich, SAD.
- P-cresol, Fenol 4- metil, puriss. p.a., ≥99.0% (GC), CAS Number 106-44-5, 42429 Sigma-Aldrich, SAD.
- Geosmin, 0,1 mg/ml u metanolu, C3888.12-100-ME, CHIRON AS, Norveška.
- 4 vinylphenol, 10 wt% solution in propylene glycol, W373923 Aldrich, SAD.
- 2,4,6–trikloranisol 100 ppb u 100% etanola, tvrtka Exi, Portugal.  
(<http://www.exi.pt/>)
- 2,4,6 – tribromanisol 100 ppb u 100% etanola, tvrtka Exi, Portugal.  
(<http://www.exi.pt/>)
- Trikloranisol deuterirani(TCA-d)-(Portugal), tvrtka Exi, Portugal.  
(<http://www.exi.pt/>)
- Sodium chloride, NaCl, CASno° 7647-14-5, Carlo Erba Reagents, Milano.

### 4.2. Instrumenti i pribor

Analiza uzoraka se provela na GC-MS uređaju Saturn 2000R, Varian (Zavoda za vinarstvo i vinogradarstvo, HCPHS), odnosno kombinacijom plinske kromatografije i masene spektrometrije uz SPME kao pripremu uzorka metodom unutarnjeg standarda upotrebom metode razvijene u sklopu izrade diplomskog rada. Navedenom metodom analizirano je 30 crnih i 10 bijelih vina starijih godišta (berba 2014. i starija) začepljenih prirodnim plutenim čepom. Uzorci vina su nasumično uzeti iz arhive Zavoda za vinarstvo i vinogradarstvo, Hrvatskog centra za poljoprivredu, hranu i selo.



Slika 11. Saturn 2000R, Varian GC/MS

Kod pripreme uzorka za analizu korištena je magnetna miješalica IKA® RET basic (Njemačka) te precizna vaga Metler Toledo (Švicarska) .



Slika 12. Magnetna miješalica i vaga

### 4.3. Uzorci

Cjelokupni popis vina sa svim podacima o godini berbe, šifre pod kojima su uzorci analizirani, sorti vina, volumenu te vrsti zatvarača nalaze se u tablici 2.

Tablica 2. Popis uzoraka s informacijama o sorti, godini berbe, vrsti zatvarača i volumenu

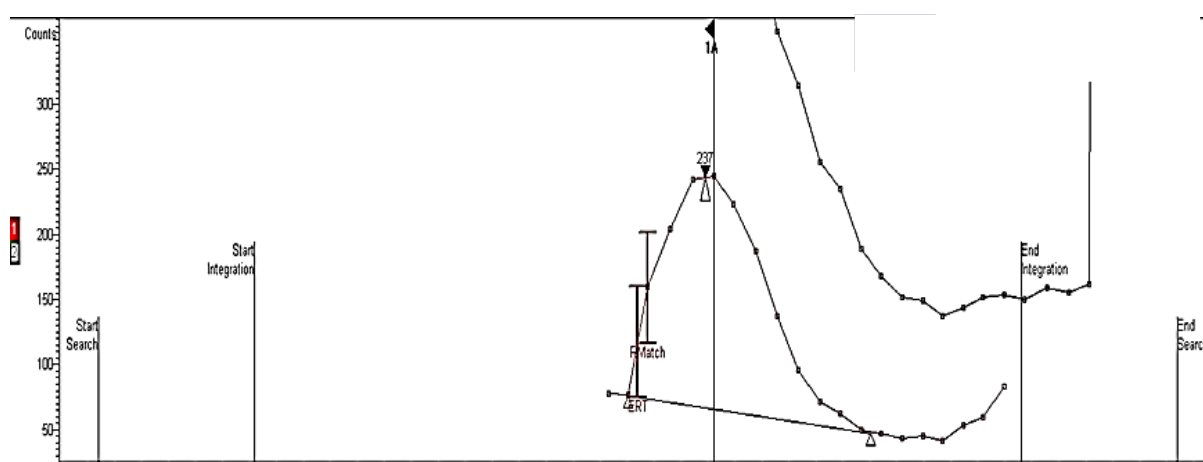
REDNI BROJ	NAZIV VINA	ŠIFRA UZORKA	GODINA BERBE	VOLUMEN BOCE (L)	VRSTA ZATVARAČA
1.	Cabarnet sauvignon	D70LNV	2013.	1	PRIRODNO PLUTO
2.	Babić	D70M6M	2012.	1	PRIRODNO PLUTO
3.	Cabarnet sauvignon	D70MIP	2011.	1	PRIRODNO PLUTO
4.	Plavac mali	D70SGX	2014.	1	PRIRODNO PLUTO
5.	Plavac	5A40BC79	2013.	1	PRIRODNO PLUTO
6.	Tera cuj	D70T78	2013.	1	PRIRODNO PLUTO
7.	Morčić	D70T7J	2014.	1	PRIRODNO PLUTO
8.	Putalj crljenak kaštelanski	D70M2A	2012.	1	PRIRODNO PLUTO
9.	Crno vino	7740D903	2011.	1	PRIRODNO PLUTO
10.	Crno vino	D70SWM	2012.	1	PRIRODNO PLUTO
11.	Plavac	EC485C19	2014.	1	PRIRODNO PLUTO
12.	Cabarnet sauvignon	D70T3X	2013.	1	PRIRODNO PLUTO
13.	Cuvee plavina +lasina	F80FA12E	2013.	1	PRIRODNO PLUTO
14.	Vino	74E4852C	2011.	1	PRIRODNO PLUTO
15.	Lasina	4AB1C9F3	2013.	1	PRIRODNO PLUTO
16.	Teran	86E62D78	2014.	1	PRIRODNO PLUTO
17.	Plavac	D70T9G	2013.	1	PRIRODNO PLUTO
18.	Plavac skaramuča	5C396619	2014.	1	PRIRODNO PLUTO
19.	Cuvee	D70T3G	2013.	1	PRIRODNO PLUTO
20.	Plavac mali	C9A400B7	2013.	1	PRIRODNO PLUTO
21.	Soare	CO5E8148	2013.	1	PRIRODNO PLUTO
22.	Plavac mali	D4022EE1	2011.	1	PRIRODNO PLUTO
23.	Teran	3A193B93	2012.	1	PRIRODNO PLUTO
24.	Cuvee	36B2E4B8	2014.	1	PRIRODNO PLUTO
25.	Frankovka	BEF271FC	2012.	1	PRIRODNO PLUTO
26.	Babić	E62BDBF4	2013.	1	PRIRODNO PLUTO
27.	Grenache	45365317	2013.	1	PRIRODNO PLUTO
28.	Merlot	33818494	2012.	1	PRIRODNO PLUTO
29.	Crno vino	D70SB9	2008.	1	PRIRODNO PLUTO
30.	Lasina	D70LD6	2012.	1	PRIRODNO PLUTO
31.	Graševina	5F8FE2DA	2014.	1	PRIRODNO PLUTO
32.	Maraština	7BA4B467	2013.	1	PRIRODNO PLUTO
33.	Chardonnay	D70SU1	2013.	1	PRIRODNO PLUTO
34.	Traminac mirisavi	D70R3H	2013.	1	PRIRODNO PLUTO
35.	Pinot bijeli	FDFO7AC5	2014.	1	PRIRODNO PLUTO
36.	Graševina	42C5DC83	2013.	1	PRIRODNO PLUTO
37.	Rajnski rizling	929C16EE	2013.	1	PRIRODNO PLUTO
38.	Pošip	E66F92FE	2010.	1	PRIRODNO PLUTO
39.	Pošip	6ADAAFE2	2011.	1	PRIRODNO PLUTO
40.	Debit	D70NXC	2012.	1	PRIRODNO PLUTO



#### 4.4. Razvoj GC/MS metode

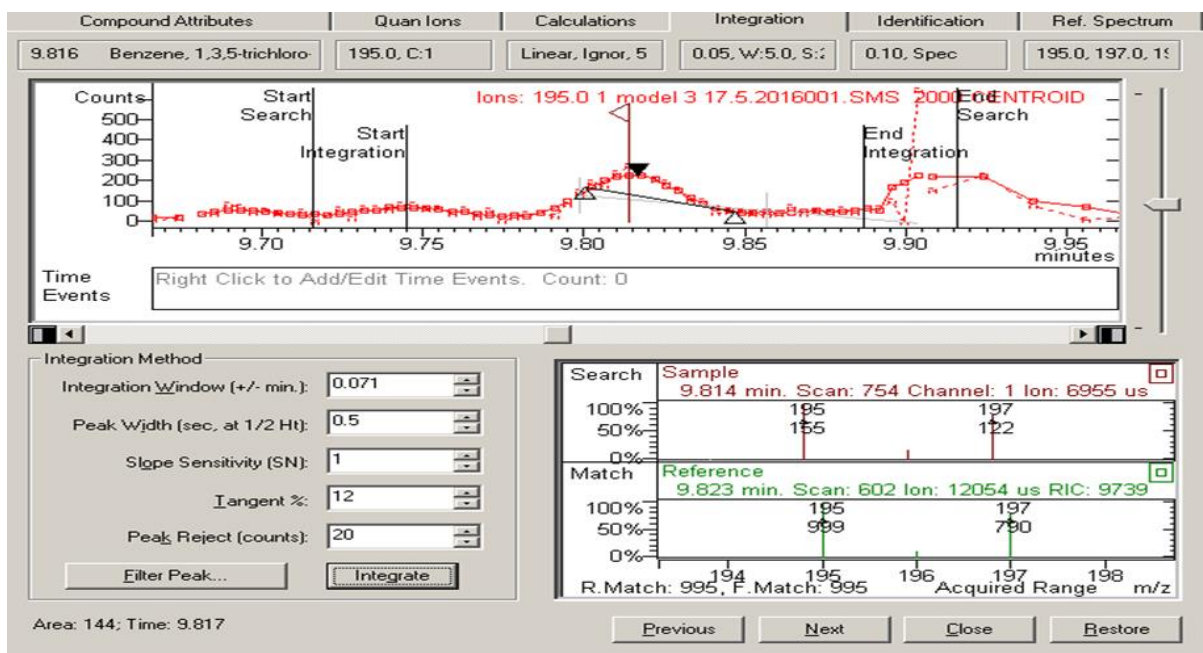
Korišteno SPME vlakno, 100  $\mu\text{m}$  polydimethylsiloxane, Supelco, SAD, Lot: P282951. U analizi je korišteno za adsorpcijski period od 20 min u gornjem dijelu vialice, nakon čega je stavljeno na desorpcijski period od 15 min u GC injektor.

Izbor vlakna i parametara ekstrakcije preuzeti su iz literature (Fischer, C., Fischer, U., 1997). Pri namještanju osjetljivosti MS te razvoja temperaturnog programa GC metode koncentriralo se na razdvajanje dTCA i TCA kao najzahtjevnijeg zadatka. Također je kvantifikacija TBA bila zahtjevna s obzirom na male koncentracije (ppt).



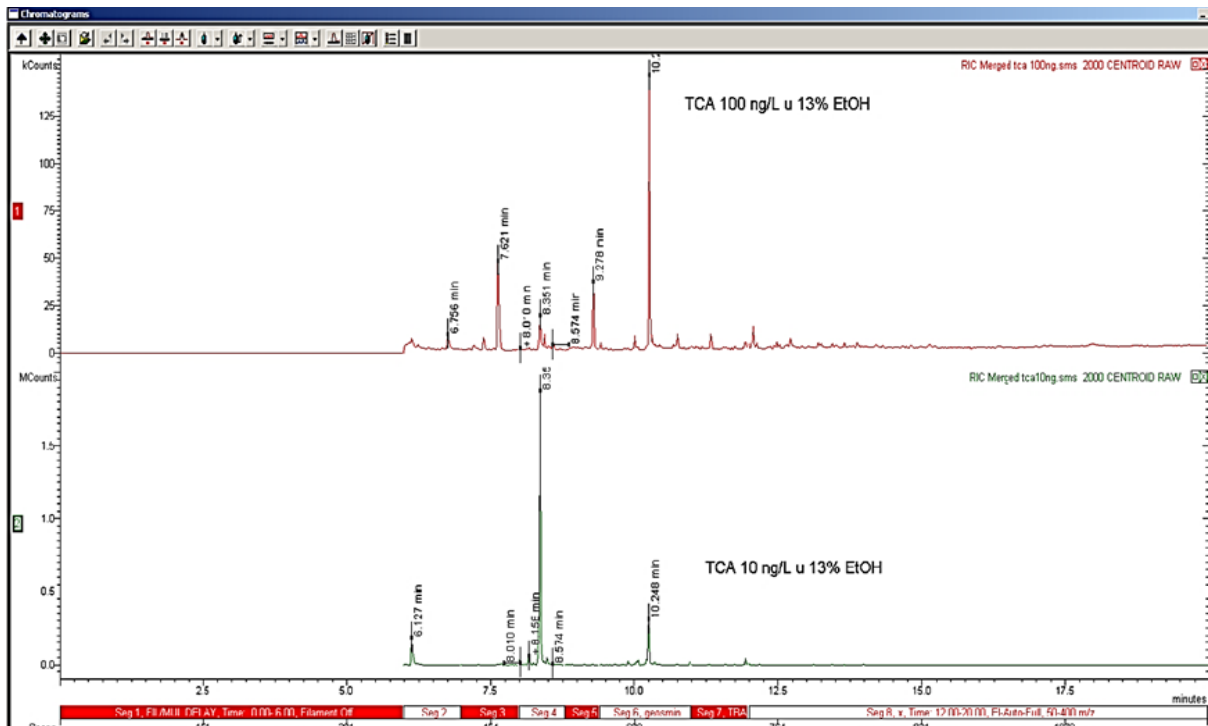
Slika 13. Kromatogram detekcije TCA u vinu

Na slici 13. može se vidjeti kromatogram gdje je promjenom temperaturnog programa smanjena temperatura injektora sa  $260^{\circ}\text{C}$  na  $250^{\circ}\text{C}$ ,  $50^{\circ}\text{C} - 2\text{min}$ ,  $200^{\circ}\text{C} - 15^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ,  $260^{\circ}\text{C} - 20^{\circ}\text{C}/\text{min}$  te je ukupno trajanje metode iznosilo 21 minutu uspjeti postići bolju detekciju TCA. Sama identifikacija se bazirala na tome da se analizirajući odnos iona 195 i 197 te povećanjem osjetljivosti uspio integrirati pik odgovarajuće veličine.

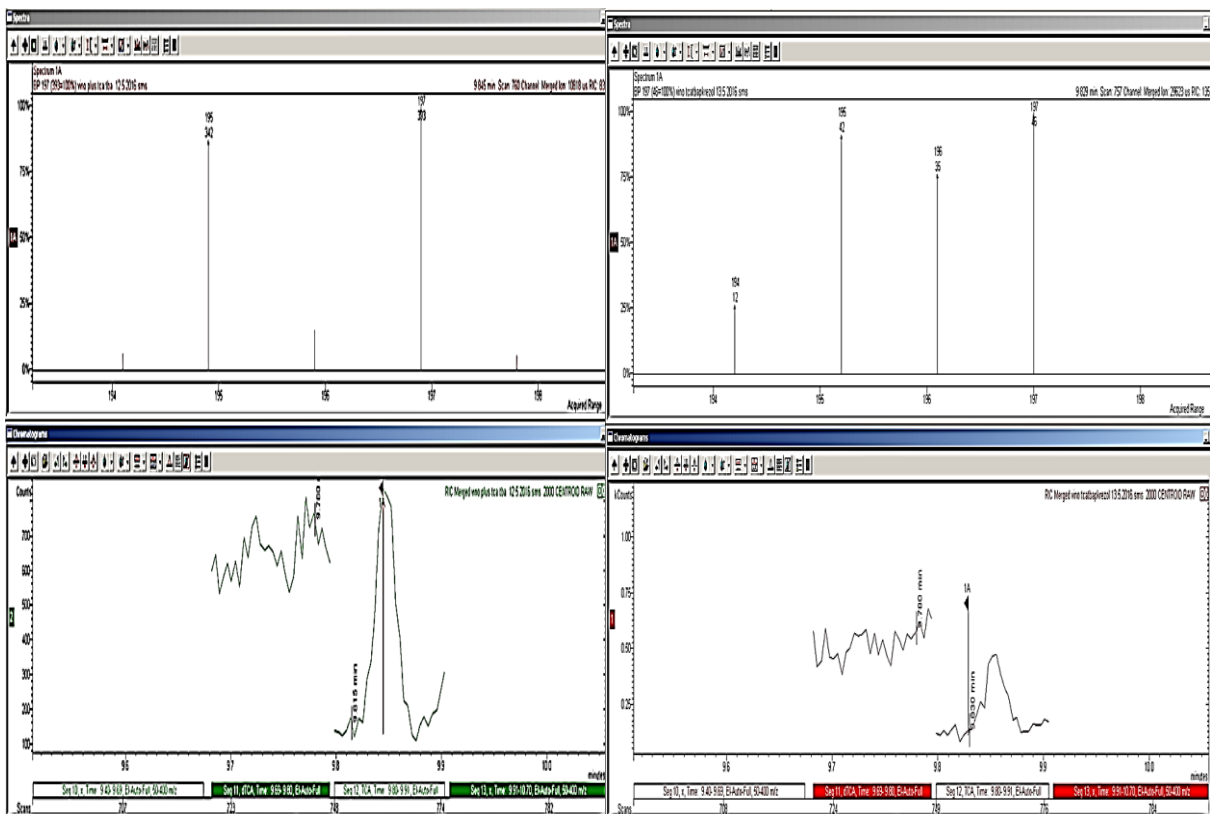


Slika 14. Integracija TCA

Provjera preklapanja spojeva od interesa s spojevima iz vina također je bila jedan od važnih zadataka jer je tokom razvoja metode došlo do preklapanja nekih neželjenih spojeva sa željenim hlapivim spojevima od interesa. Pa se tako TCA preklapao sa butil kaprilatom, 4EF se preklapao sa oktanskom kiselinom, a geosmin je bio problematičan za identifikaciju zbog preklapanja sa butandioik dietil esterom. Promjenom MS parametara uspješno je detektiran spoj kao geosmin karakterističnih iona: 112,125,149 bez ikakvih preklapanja što je može vidjeti na slici 20.



Slika 15. Kromatogram modelne otopine TCA u 13%EtOH



Slika 16. Kromatogram modelne otopine TCA u vinu

Konačni temperaturni program 50°C – 2 min  $\Rightarrow$  155°C, 15°C/min - 1 min  $\Rightarrow$  170°C, 5°C/min  $\Rightarrow$  260°C, 20°C/min- 3 min. Program je namješten tako da trajanje cijele analize iznosi 20,50 min.

Provjera metode napravljena je na način da je u vino poznatog sastava dodana određena koncentracija modelnih otopina pojedinog spoja. Provjera je napravljena na uzorku D70SB9 crno vino čiji se dobiveni rezultati nalaze u tablici 3 i 4.

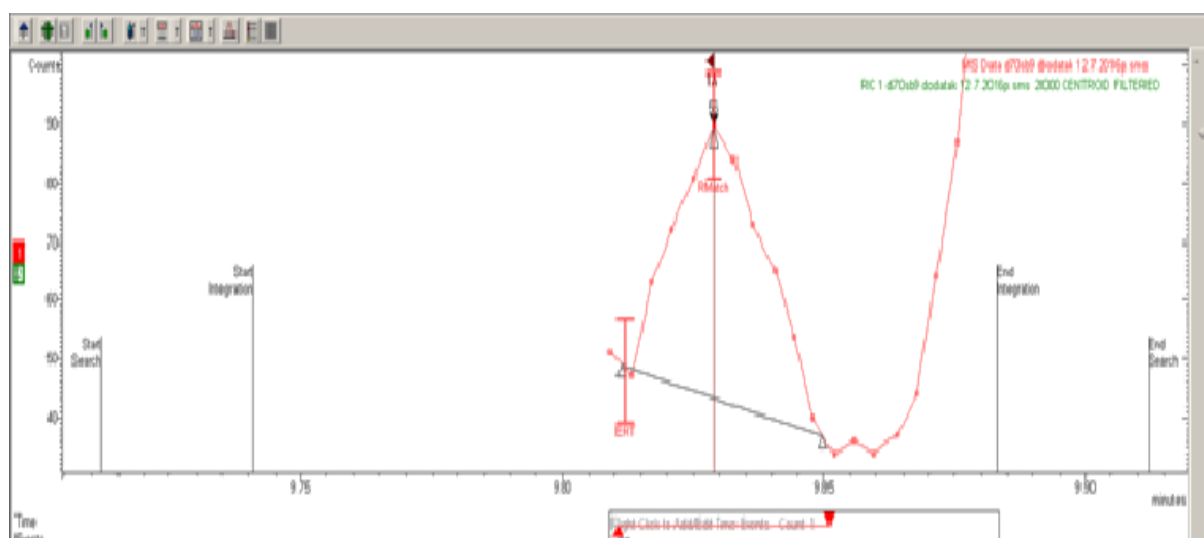
Tablica 3. Rezultati analize GC – MS uzorka D70SB9

4-etil fenol	4 – etil guaiakol	4 – vinil fenol	Geosmin	TBA	TCA
1,748	0,260	0	0	0	N/A

Tablica 4. Rezultati analize nakon dodatka spojeva od interesa

4-etil fenol	4-etil guaiakol	4 – vinil fenol	Geosmin	TBA	TCA
2,881	1,014	0	8,989	38,49	22,36

TCA je identificiran nakon dodatka standarda i na slici 17. možemo vidjeti kromatogram s potvrdom TCA u vinu.



Slika 17. Kromatogram dokaza TCA u vinu

Napravljena je i analiza uzorka bijelog vina poznatog sastava dostavljenog od mr.sc. Renate Leder. Rezultati analize vina poznatog sastava nalaze se u tablici 5, dok su rezultati analize istog uzorka analizirani na razvijenoj metodi u tablici 6.

Može se zaključiti da se svi rezultati nalaze u dopuštenom rasponu, dok jedino TBA pokazuje malo više koncentracije.

Tablica 5. Rezultati analize vina poznatog sastava

4-etil fenol (mg/l)	4-etil guaiakol (mg/l)	Geosmin (ng/l)	TBA (ng/l)	TCA (ng/l)
0,359 (0,419-0,299)	0,446 (0,560-0,332)	135 (205-66,3)	17,2 (26- 8,4)	13,8 (17,4-10,2)

Tablica 6. Rezultati analize vina razvijenom metodom

4-etil fenol (mg/l)	4-etil guaiakol (mg/l)	Geosmin (ng/l)	TBA (ng/l)	TCA (ng/l)
0,323	0,380	82,66	28,52	16,67

#### 4.4.1. Kalibracija metode

Kalibracijski dijagram dobiven je mjerenjem pikova serije standardnih, modelnih otopina pri točno određenim uvjetima. Standardne otopine su pripravljene u 5 koncentracija prikazane u tablici 7 .

Modelne otopine pripravljene su u tikvicama od 100 mL u koju su ovisno o kalibracijskoj točki dodane određene koncentracije pojedinog spoja. Također u svaku modelnu otopinu dodano je 100 $\mu$ L internog standarda para krezola koncentracije 1000 mg/L i 50  $\mu$ L internog standarda deuteriranog trikloranisola. Kalibracijske krivulje pojedinog spoja nalaze se u prilogu 1.

Tablica 7. Koncentracije modelnih, radnih otopina

	<b>TCA, TBA (ng/l)</b>	<b>4EF (mg/l)</b>	<b>4EG (mg/l)</b>	<b>4VF (mg/l)</b>	<b>GSM (ng/l)</b>
<b>Model otopina 1</b>	1,2	0,325	0,226	0,15	9
<b>Model otopina 2</b>	3,2	0,975	0,679	0,45	24
<b>Model otopina 3</b>	7,2	1,95	1,358	0,9	54
<b>Model otopina 4</b>	12	3,25	2,263	1,5	90
<b>Model otopina 5</b>	40	5,85	4,075	2,7	210

\*TCA- Trikloranisol; TBA- Tribromanisol; 4EF- 4 etil fenol; 4EG- 4 etil guaiakol; 4VF- 4 vinil fenol;

GSM- geosmin

#### 4.4.2. Priprema uzoraka za analizu

U odmjernu tikvicu od 100 mL dodano je 50 mL uzorka, nakon toga 100  $\mu$ L internog standarda para krezola koncentracije 1000 mg/L. Potom je uzorak promiješan i nakon toga nadopunjeno vinom do oznake.



Slika 18. Priprema uzorka za analizu na magnetnoj miješalici

10 mL uzorka stavljeno u 20 mL SPME bočicu s 3 g NaCl –a i 50  $\mu$ L internog standarda deuteriranog trikloranisola koncentracije 3 ng/L direktno u SPME bočicu. Tako pripremljeni uzorak stavljen je grijati na 52°C i magnet na 300 okretaja u minuti, 20 minuta. Analiza traje 20 minuta, a uzorak se injektirao svakih 40 minuta.

#### 4.4.3. Identifikacija i kvantifikacija (MS parametri)

Spojevi su kvantificirani pomoću omjera područja glavnih karakterističnih iona za pojedini spoj vidljivih u tablici 8. Količina svakog spoja dobivena je usporedbom sa standardnim modelnim otopinama koje su napravljene u 5 koncentracija.

Tablica 8. MS parametri korišteni za određivanje pojedinog spoja u uzorku

Spoj	Vrijeme retencije	Kvantifikacijski ioni	Interni standard
Fenol 4- metil	7.014	106.9, 108	+
4 - etil fenol	8.007	107,122	-
4 - vinil fenol	8.523	91, 120	-
4 - etil guaiakol	9.197	137, 152	-
d TCA	9.780	199,215	+
2,4,6 trikloranisol	9.812	195	-
2,4,6 tribromanisol	13.810	344, 346	-
Geosmin	10.837	112, 125, 149	-

\*d TCA- deuterirani trikloranisol

#### 4.4.4. Kromatografski uvjeti

Kromatografska kolona koja je korištena ima sljedeće karakteristike: RTX®5, duljine 30 metara, 0.25mmID, 0.25µm debljina aktivnog sloja.



Slika 19. Kromatografska kolona



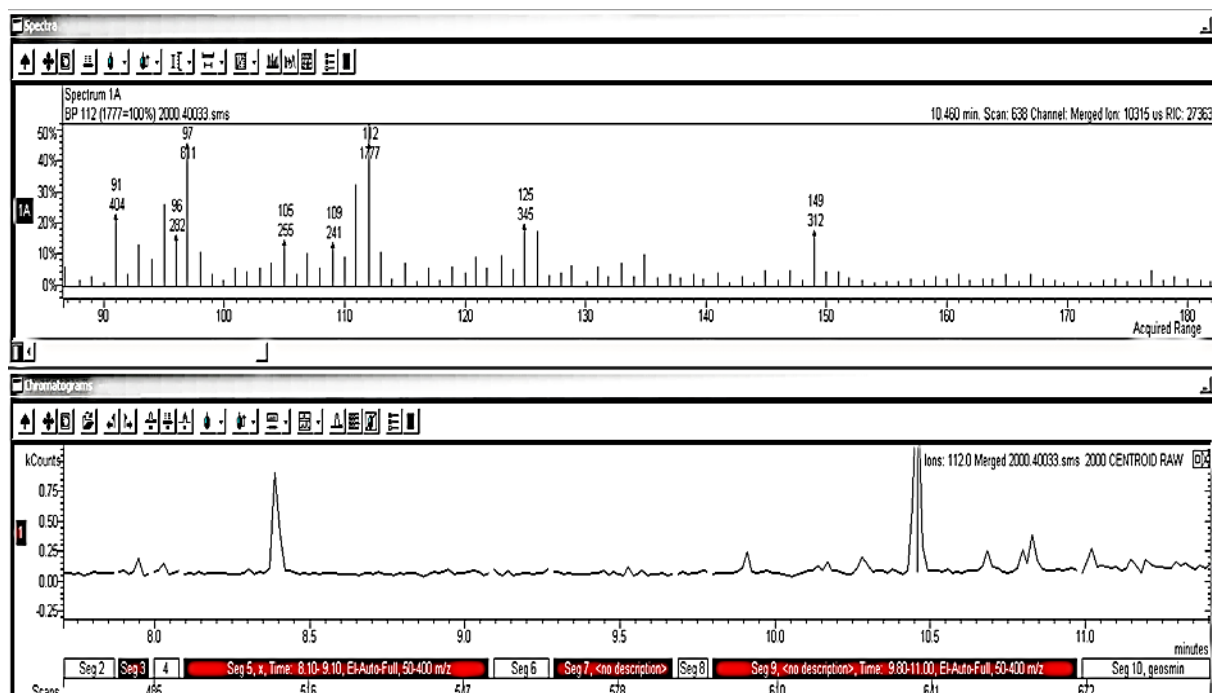
## 5. REZULTATI I RASPRAVA

### 5.1. Razvoj GC-MS metode

U analizi korišteno SPME vlakno, 100  $\mu\text{m}$  polydimethylsiloxane. Za adsorpcijski period od 20 min u koriteno je u gornjem dijelu vialice, nakon čega je stavljeno na desorpcijski period od 15 min u GC injektor.

Izbor vlakna i parametara ekstrakcije je preuzeto iz literature (Fischer, C., Fischer, U., 1997). Pri namještanju osjetljivosti MS te razvoja temperaturnog programa GC metode koncentriralo se na razdvajanje dTCA i TCA kao najtežeg zadatka. Kvantifikacija TBA bila je također zahtjevna s obzirom na male koncentracije (ppt).

Provjera preklapanja spojeva od interesa s spojevima iz vina također je bila jedan od važnih zadataka jer je tokom razvoja metode došlo do preklapanja nekih neželjenih spojeva sa željenim hlapivim spojevima od interesa. Pa se tako TCA preklapao sa butil kaprilatom, 4EF se preklapao sa oktanskom kiselinom, a geosmin je bio problematičan za identifikaciju zbog preklapanja sa butandioik dietil esterom. Promjenom MS parametara uspješno je detektiran spoj kao geosmin karakterističnih iona 112,125,149 bez ikakvih preklapanja što je može vidjeti na slici 20.



Slika 20. Detekcija geosmina

Rezultati GC/MS analize uzoraka nalaze se u tablici 9, a koncentracije su izračunate metodom srednje vrijednosti dviju paralela istog uzorka.

U svim uzorcima crnog vina pronađen je 4 etil fenol i 4 etil guaiakol u rasponu od 0,008-1,734 mg/l za 4 etil fenol, a 4etil guaiakol se nalazio u rasponu od 0,001- 0,248 mg/l. U samo jednom uzorku bijelog vina pronađena je koncentracija od 0,322 mg/l za 4 etil fenol dok je u ostalima bio ispod limita detekcije. Vinil fenol je detektiran samo u jednom uzorku u koncentraciji od 0,24 mg/l, kao i TBA u koncentraciji od 35,39 ng/l. Geosmin je također detektiran u samo jednom uzorku a to bi se možda moglo povezati sa analizom fizikalno kemijskih parametara gdje je utvrđeno da ima nižu koncentraciju ukupnog alkohola.

Izvor kontaminacije TCA i/ili TBA je moguć zbog korištenja plutenih čepova kao zatvarača boca. Pluto je korišteno kao zatvarač za boce vina već od 17. stoljeća zbog svojih jedinstvenih fizikalnih svojstava, uključujući dugotrajnu fleksibilnost, hidrofobnost i nepropusnost za zrak (Fischer, C., Fischer, U.,1997), ali je šansa vrlo mala te se može zaključiti da je izvor kontaminacije neki drugi problem koji se može detaljnije istražiti. Senzorski pragovi osjetljivosti za 2,4,6-TCA mogu varirati od 4 ng/l (Amon i sur.,1989) do 10 ng/l (Tanner i sur., 1981) u bijelom vinu i 50 ng/l u crnim vinima (Tanner i sur., 1981).

TCA imaju vrlo niski senzorski prag percepcije u vinu, ali je koncentracija koja se može detektirati da ukazuje na TCA može također ovisiti o svojstvima i sastavu vina. TCA se može kretati u rasponu od 0,03-10,0 ng/l (Evans, i sur., 1997; Ribéreau-Gayon i sur., 1998) dok koncentracija TCA za koju se smatra da može proizvesti nedostatak u vinu puno veća, u rasponu od 10 do 40 ng/l (Silva i sur., 2000)

Tablica 9. Rezultati GC/MS analize uzoraka

REDNI BROJ	šifra uzorka	4EF (mg/l)	4EG (mg/l)	VF (mg/l)	GEO (ng/l)	TBA (ng/l)	TCA (ng/l)	dTca (ng/l)	Pcresol (mg/l)
1.	D70LNV	0,07	0,021	0	0	0	0	15	1
2.	D70M6M	0,1	0,001	0	0	0	0	15	1
3.	D70MIP	0,14	0	0	0	0	0	15	1
4.	D70SGX	0,39	0,06	0	0	0	0	15	1
5.	5A40BC79	0,19	0,04	0	0	0	0	15	1
6.	D70T78	0,30	0,19	0,24	0,63	0	0	15	1
7.	D70T7J	0,73	0,24	0	0	0	0	15	1
8.	D70M2A	N/A	0,004	0	0	0	0	15	1
9.	7740D903	0,54	0,03	0	0	0	0	15	1
10.	D70SWM	0,22	0,06	0	0	0	0	15	1
11.	EC485C19	0,60	0,08	0	0	0	0	15	1
12.	D70T3X	1,33	0,05	0	0	0	0	15	1
13.	F80FA12E	0,55	0,04	0	0	35,39	0	15	1
14.	74E4852C	0,17	0,04	0	0	0	0	15	1
15.	4AB1C9F3	0,28	0,04	0	0	0	0	15	1
16.	86E62D78	0,14	0,06	0	0	0	0	15	1
17.	D70T9G	0,24	0,04	0	0	0	0	15	1
18.	5C396619	0,09	0,03	0	0	0	0	15	1
19.	D70T3G	1,09	0,23	0	0	0	0	15	1
20.	C9A400B7	0,03	0,03	0	0	0	0	15	1
21.	CO5E8148	0,01	0,01	0	0	0	0	15	1
22.	D4022EE1	0,64	0,19	0	0	0	0	15	1
23.	3A193B93	0,22	0,06	0	0	0	0	15	1
24.	36B2E4B8	0,54	0,06	0	0	0	0	15	1
25.	BEF271FC	0,1	0,05	0	0	0	0	15	1
26.	E62BDBF4	0,49	0,16	0	0	0	0	15	1
27.	45365317	0,03	0,25	0	0	0	0	15	1
28.	33818494	0,05	0,02	0	0	0	0	15	1
29.	D70SB9	1,73	0,25	0	0	0	0	15	1
30.	D70LD6	0,06	0,04	0	0	0	0	15	1
31.	5F8FE2DA	0,32	0,13	0	0	0	0	15	1
32.	7BA4B467	N/A	0,01	0	0	0	0	15	1
33.	D70SU1	N/A	0,003	0	0	0	0	15	1
34.	D70R3H	N/A	0,004	0	0	0	0	15	1
35.	FDF07AC5	N/A	0,002	0	0	0	0	15	1
36.	42C5DC83	N/A	0,003	0	0	0	0	15	1
37.	929C16EE	N/A	0,02	0	0	0	0	15	1
38.	E66F92FE	N/A	0,035	0	0	0	0	15	1
39.	6ADAAFE2	N/A	0,003	0	0	0	0	15	1
40.	D70NXC	N/A	0,001	0	0	0	0	15	1

## 6. ZAKLJUČAK

Razvijena je GC-MS metoda za analizu hlapivih spojeva: 2,4,6 trikloranisol, 2,4,6 tribromanisol, geosmin, 4 etil fenol, 4 etil guaiakol i 4 vinil fenol koji daju negativnu aromu vinu.

Analizom je zaključeno da je su u svim uzorcima crnog vina pronađeni 4 etil fenol u rasponu od 0,0-1,73 mg/l za 4 etil fenol. U samo jednom uzorku bijelog vina pronađena je koncentracija od 0,32 mg/l za 4 etil fenol dok je u ostalima bio ispod limita detekcije.

4 etil guaiakol se nalazio u rasponu od 0,001- 0,25mg/l.

4 - vinil fenol je detektiran samo u jednom uzorku u koncentraciji od 0,24mg/l.

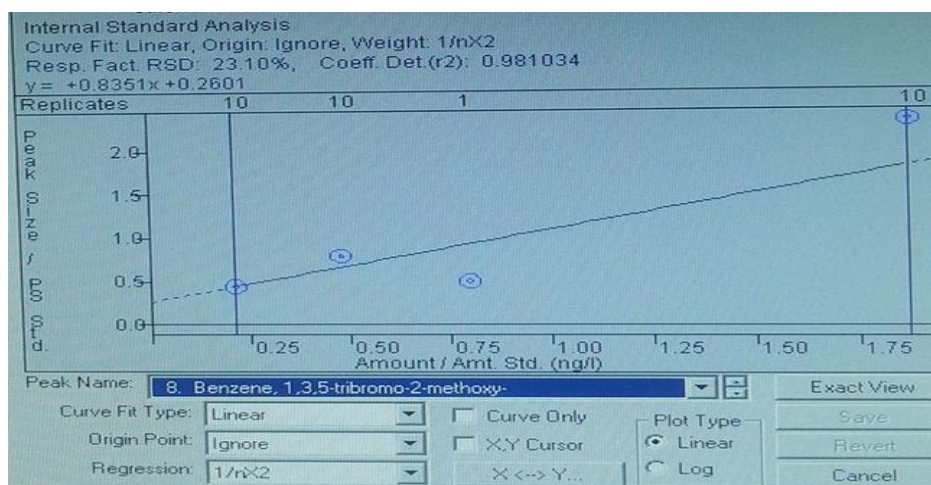
TBA je detektiran također samo u jednom uzorku u koncentraciji od 35,39 ng/l.

Geosmin je detektiran u samo jednom uzorku u koncentraciji 0,63ng/L. To bi se moglo povezati sa analizom fizikalno kemijskih parametara gdje je utvrđeno da ima nižu koncentraciju ukupnog alkohola.

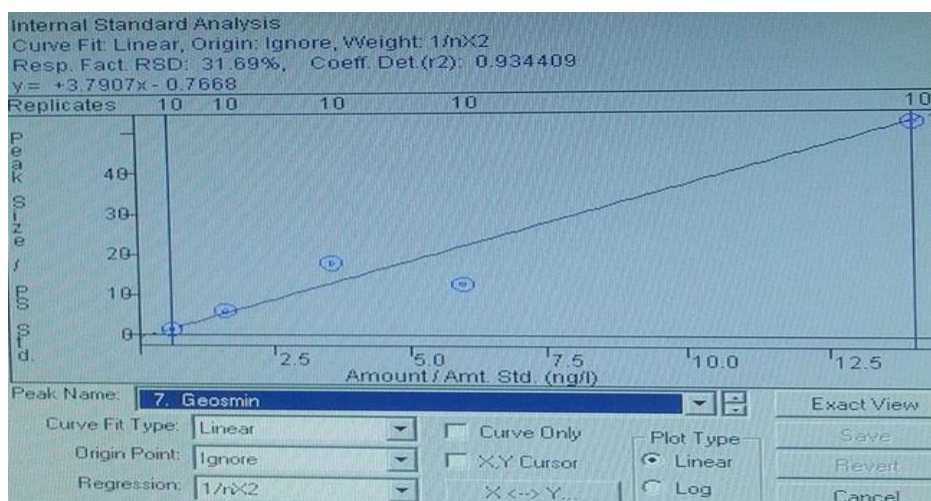
Modifikacijom i doradom metode ista bi se mogla koristiti pri daljnjim analizama i detekciji navedenih kontaminanata kako bi se u budućnosti smanjila njihova prisutnost u vinu. Upotrebom masenog detektora boljih karakteristika (kvadrupolni analizator mase) bi se prag detekcije i kvantifikacije mogao poboljšati.

## 7. DODACI

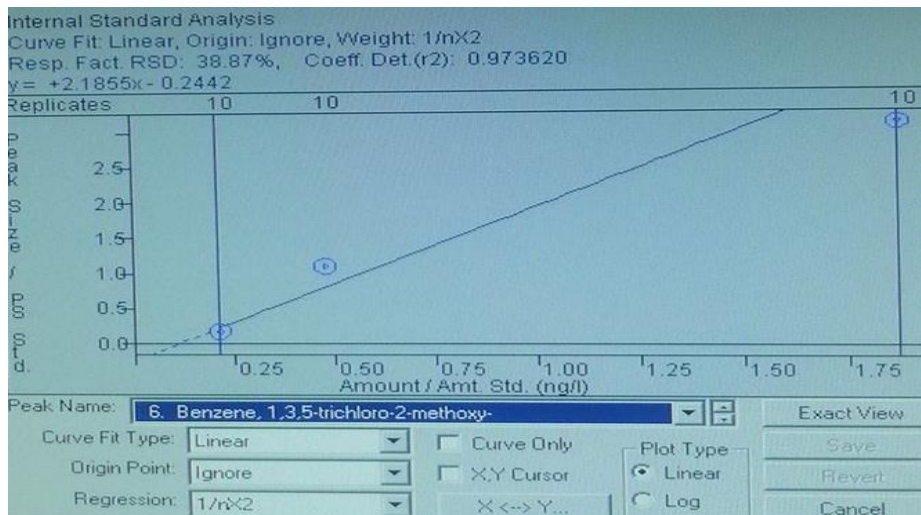
### 7.1. Prilozi



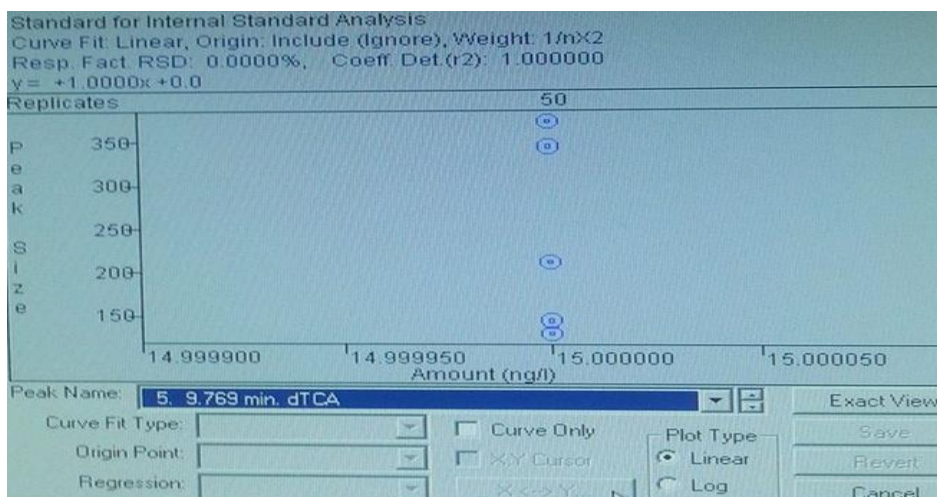
Slika 21. Kalibracijska krivulja TBA



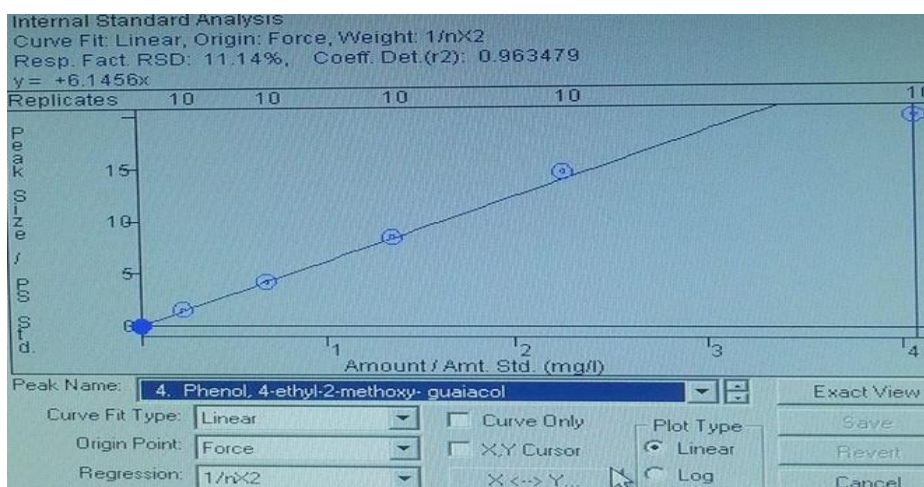
Slika 22. Kalibracijska krivulja geosmina



Slika 23. Kalibracijska krivulja TCA

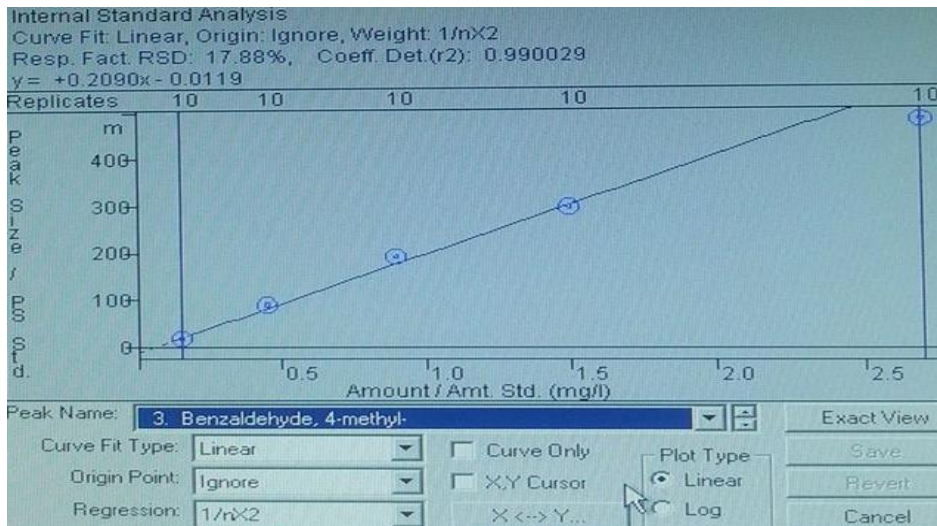


Slika 24. Kalibracijska krivulja internog standarda d TCA

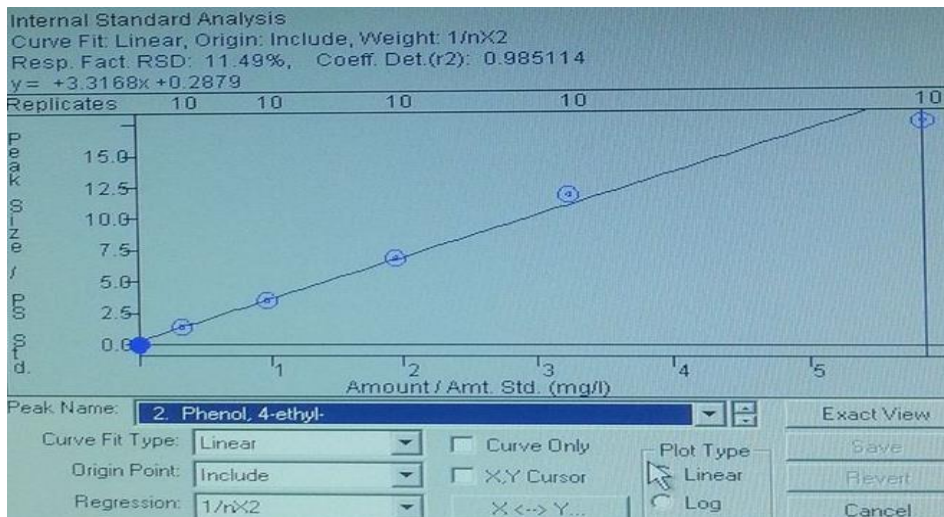


Slika 25. Kalibracijska krivulja 4- etil guaiakola

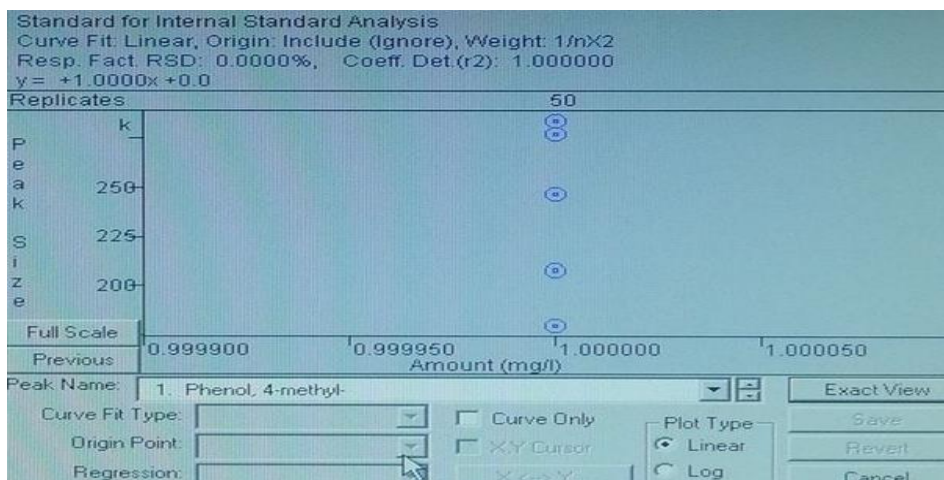




Slika 26. Kalibracijska krivulja 4 -vinil fenola



Slika 27. Kalibracijska krivulja 4 - etil fenola



Slika 28. Kalibracijska krivulja p - krezola

## 7.2. Rezultati analize fizikalno kemijskih parametara u vinu

ŠIFRA	Godina berbe	Relativna gustoća (20/20°C)	Ukupni alkohol	Stvami alkohol	Stvami alkohol	Ukupni ekstrakt suhi	Reducirajući šećeri	Ekstrakt bez reducirajućih šećera	Ekstrakt bez reducirajućih i nehlapive kiseline	Pepeo	pH	Ukupna Kiselost (kao vinska)	Hlapiva kiselost (kao octena)	Nehlapiva Kiselost (kao vinska)	Slobodni sumporni dioksid	Ukupni sumporni dioksid
D70LNV	2013.	0,9936	13,2	13	102,4	27,4	4	24,4	18,8	2,1	3,4	6	0,4	5,6	13	66
D70MGM	2012.	0,9943	14,4	14,2	111,9	32,6	3,7	29,9	23,7	2,3	3,3	6,6	0,3	6,2	3	36
D70MIP	2011.	0,9956	13	12,9	101,7	32,2	2,4	30,8	24,2	2,5	3,5	6,9	0,2	6,6	9	52
D70SGX	2014.	0,9925	13	12,8	101,2	24,1	2,5	22,6	17,7	1,9	3,4	5,5	0,5	4,9	6	49
5A40BC79	2013.	0,9949	13,7	13,5	106,2	32,1	4,6	28,5	24,3	2,8	3,8	5	0,6	4,2	24	57
D70T78	2013.	0,9927	12,5	12,5	98,3	23,5	1,4	23,1	18	2,7	3,4	5,6	0,4	5,1	6	28
D70T7J	2014.	0,9955	11,7	11,6	91,2	28,1	2,1	27	21,6	3	3,4	6,4	0,8	5,4	6	46
D70M2A	2012.	0,994	15	14,8	117,1	33,3	4,4	29,9	25,4	2,6	3,6	5,3	0,6	4,5	8	59
7740D903	2011.	0,9946	14,5	14,3	112,6	33,7	3,7	31	26,4	2,9	3,8	5,5	0,7	4,6	13	87
D70SWM	2012.	0,9933	13	12,9	101,5	26,3	1,6	25,7	20	2,1	3,4	6,7	0,8	5,7	12	126
EC485C19	2014.	0,9925	13,8	13,7	108	26,6	1,5	26,1	19,2	2,4	3,3	7,5	0,5	6,9	3	82
D70T3X	2013.	0,9946	12,5	12,4	97,6	28,1	1,7	27,4	22,8	2,7	3,5	5	0,4	4,6	10	0
F80FA12E	2013.	0,994	12,5	12,3	96,8	26,4	4,7	22,7	17,8	2,5	3,4	5,4	0,4	4,9	17	92
74E4852C	2011.	0,9954	12,6	12,3	97,3	30,1	5,3	25,8	21,4	2,9	3,7	5,2	0,7	4,4	13	47
4AB1C9F3	2013.	0,9938	12,6	12,3	96,7	25,8	5,4	21,4	15,9	2,1	3,3	6,1	0,5	5,5	12	137
86E62D78	2014.	1,0271	16,4	11,8	92,8	111	78	34	26,3	2,4	3	8,4	0,6	7,7	8	46
D70T9G	2013.	0,995	13,7	13,4	106	32,4	4,9	28,5	24,4	2,8	3,8	4,9	0,6	4,1	24	52
5C396619	2014.	0,9946	12,4	12,3	97,2	28	2,1	26,9	22,4	2,8	3,7	5,3	0,6	4,5	13	40
D70T3G	2013.	0,9932	13,3	13,2	103,9	26,9	1,6	26,3	20,6	2,7	3,5	6,6	0,7	5,7	7	62
C9A400B7	2013.	0,9945	12,7	12,6	99,1	28,7	1,8	27,9	23,1	2,7	3,6	5,7	0,7	4,8	18	72
C05E8148	2013.	0,9928	13,3	13,2	103,9	25,9	1,4	25,5	19,9	2,3	3,5	6,5	0,7	5,6	15	42
D4022EE1	2011.	0,9937	12,7	12,6	99,4	26,6	2	25,6	21,2	2,5	3,7	5,2	0,6	4,4	7	51
3A193B93	2012.	0,994	13,5	13,4	106,1	29,8	1,8	29	21	2,5	3,1	8,6	0,5	8	28	66
BEF271FC	2012.	0,9955	11,7	11,5	90,8	27,8	2,9	25,9	19,8	2,2	3,2	6,8	0,5	6,1	39	139
E62BDBF4	2013.	0,9949	12,8	12,6	99,7	29,8	3	27,8	22,5	2,4	3,5	6,2	0,7	5,3	22	75
45365317	2013.	0,9926	14,6	14,5	114	29	3,1	26,9	20,8	2,2	3,3	6,7	0,5	6,1	6	52
33818494	2012.	0,9949	13,1	12,8	101,3	30,4	4,1	27,3	21,8	2,2	3,4	6,1	0,4	5,5	26	89
D70S89	2008.	0,9929	13,1	12,9	102,1	25,5	1,9	24,6	19,7	2,4	3,5	6,5	1,3	4,9	6	38
D70LD6	2012.	0,9937	13,4	13,3	105	28	3	26,1	21,6	2,3	3,5	5,2	0,6	4,5	7	21
5F8FE2DA	2014.	0,9933	11,7	11,6	91,3	22,4	1,6	21,8	15,8	2,2	3,2	6,4	0,4	6	20	119
7BA4B467	2013.	0,9937	11,4	11,2	88,6	22,4	2,8	20,6	15	2,8	3,4	6	0,3	5,6	8	199
D70SU1	2013.	0,9919	13,4	13,3	105,1	24,1	2,2	22,9	15,9	2,3	3,3	7,4	0,4	7	9	122
D70R3H	2013.	0,9923	13,7	13,5	106,4	25,5	4,3	22,2	18,1	2,4	3,6	4,6	0,4	4,1	29	299
FDFO7AC5	2014.	0,9928	12,5	12,3	96,8	23,2	3,5	20,7	14,6	2,1	3,1	6,5	0,3	6,1	15	61
42C5DC83	2013.	0,9929	12	11,8	93,2	22,1	4	19,1	12,6	1,9	3,1	7	0,3	6,5	21	94
929C16EE	2013.	0,9926	12,6	12,4	97,7	22,9	4,5	19,4	13,5	1,7	3,2	6,4	0,4	5,9	19	167
E66F92FE	2010.	0,9902	13,4	13,4	105,4	19,8	1,6	19,2	13,9	2,1	3,3	5,8	0,5	5,3	4	177
6ADAAFE2	2011.	0,9977	14,2	13,4	105,4	39,7	13,5	27,2	22,8	3,7	3,8	5,6	0,9	4,4	27	194
D70NXC	2012.	0,9903	12,5	12,4	98,2	17,1	1	17,1	12,5	1,5	3,1	5	0,3	4,6	22	120
36B2E4B8	2014.	0,9967	12,3	12	94,9	32,5	5,2	28,3	19,6	2,6	3,2	9,2	0,4	8,7	7	109



## 7.2. Popis slika

Slika 1. <i>Botrytis cinerea</i> na grozdu .....	2
Slika 2. Proces nastanka 2,4,6 trikloranisola .....	5
Slika 3. Strukturna formula 2,4,6 tribromanisola .....	5
Slika 4. <i>Streptomyces coelicolor</i> .....	6
Slika 5. Strukturna formula geosmina [ (4S,4aS,8aR)-4,8a-dimethyloctahydronaphtalen-4a(2H)-ol].....	7
Slika 6. <i>Brettanomyces bruxellensis</i> u fermentaciji.....	8
Slika 7. Put nastanka 4-etil fenola i 4-etil guaiakola u vinu .....	9
Slika 8. Shematski prikaz GC/MS .....	12
Slika 9. Princip rada masenog spektrometra .....	13
Slika 10. Kvadrupolni analizator mase.....	14
Slika 11. Saturn 2000R, Varian GC/MS.....	16
Slika 12. Magnetna miješalica i vaga .....	16
Slika 13. Kromatogram detekcije TCA u vinu .....	18
Slika 14. Integracija TCA.....	19
Slika 15. Kromatogram modelne otopine TCA u 13% EtOH .....	20
Slika 16. Kromatogram modelne otopine TCA u vinu.....	20
Slika 17. Kromatogram dokaza TCA u vinu .....	21
Slika 18. Priprema uzorka za analizu na magnetnoj miješalici .....	24
Slika 19. Kromatografska kolona .....	25
Slika 20. Detekcija geosmina .....	26
Slika 21. Kalibracijska krivulja TBA .....	30
Slika 22. Kalibracijska krivulja geosmina .....	30
Slika 23. Kalibracijska krivulja TCA .....	31
Slika 24. Kalibracijska krivulja internog standarda d TCA.....	31
Slika 25. Kalibracijska krivulja 4- etil guaiakola .....	31
Slika 26. Kalibracijska krivulja 4 -vinil fenola.....	32
Slika 27. Kalibracijska krivulja 4 - etil fenola.....	32
Slika 28. Kalibracijska krivulja p - krezola .....	32

## 7.3. Popis tablica

Tablica 1. Ključni parametri kod određivanja hlapivih spojeva na GC/MS uređaju .....	3
Tablica 2. Popis uzoraka s informacijama o sorti, godini berbe, vrsti zatvarača i volumenu .....	17
Tablica 3. Rezultati analize GC – MS uzorka D70SB9.....	21
Tablica 4. Rezultati analize nakon dodatka spojeva od interesa .....	21
Tablica 5. Rezultati analize vina poznatog sastava .....	22
Tablica 6. Rezultati analize vina razvijenom metodom.....	22
Tablica 7. Koncentracije modelnih, radnih otopina.....	23
Tablica 8. MS parametri korišteni za određivanje pojedinog spoja u uzorku .....	25
Tablica 9. Rezultati GC/MS analize uzoraka .....	28

## 8. POPIS LITERATURE

Alzaga,R. ,Ortiz, L., Sanchez-Baeza, F., M.-Pilar Marco, Bayona, J.M (2003.). Accurate Determination of 2,4,6-Trichloroanisole in Wines at Low Parts Per Trillion by Solid-Phase Microextraction Followed by GC-ECD, *J. Agric. Food Chem.* 51, 3509–3514

Amon, J. M.; Vandeppeer, J. M.; Simpson, R. F. (1989.) Compounds responsible for cork taint in wine. *Wine Ind. J.* 4, 62- 69.

Botelho,G. Valiau, C., Moreira da Silva A.(2013.) Effect of cyclodextrins on off-odours removal of red wine: An innovative approach, *Ciência e Técnica Vitivinícola*

Boutou, S., Bonnet, S., Labadie, M-D., Chatonnet, P. (2004.) Identification and Responsibility of 2,4,6- Tribromoanisole in Musty, Corked Odors in Wine, *Znanstveni članak, Journal of agricultural and food chemistry.*

Boutou, S., Chatonnet, P. (2007) Rapid headspace solid-phase microextraction/gas chromatographic/mass spectrometric assay for the quantitative determination of some of the main odorants causing off-flavours in wine, *Journal of Chromatography A*, 1141 1–9.

Cabrita, M. J. B., Garcia, R., Martins, N., D.R. Gomes da Silva, M., Costa Freitas, A.M. (2012) Gas Chromatography in the Analysis of Compounds Released from Wood into Wine, *Znanstveni članak, University of Évora, Évora, Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology,New University of Lisbon, Campus Caparica, Portugal.*

Darriet, P., Pons, M., Lamy, S., Dubourdieu, D.(2000.) Identification and quantification of geosmin, an earthy odorant contaminating wines., *Znanstveni članak, Journal of agricultural and food chemistry.*:4835-8.

Djaković, S. (2015.) Masena spektrometrija (MS), [http://moodle.srce.hr/2015-2016/pluginfile.php/703293/mod\\_label/intro/ms.pdf](http://moodle.srce.hr/2015-2016/pluginfile.php/703293/mod_label/intro/ms.pdf) prezentacija s predavanja, PBF (26.06.2016.)

Evans, T. J.; Butzke, C. E.; Ebeler, S. E. (1997.) Analysis of 2,4,6-trichloroanisole in wines using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 786, 293-298.

- Fischer, C., Fischer, U.(1997.) Analysis of Cork Taint in Wine and Cork Material at Olfactory Subthreshold Levels by Solid Phase Microextraction. *J. Agric. Food Chem.*
- Hayasaka, Y., Baldock, G.A., Pollnitz, A.P.(2005.) Contributions of mass spectrometry in The Australian Wine Research Institute to advances in knowledge of grape and wine constituents.
- La Guerche, S., Dauphin, B., Pons, M., Blancard, D., Darriet, P.(2006.) Characterization of Some Mushroom and Earthy Off-Odors Microbially Induced by the Development of Rot on Grapes, *Znanstveni članak, J. Agric. Food Chem.*
- Lisanti, M.T., Gambuti, A., Genovese, A., Piombino, P., Moio, L. (2014.) Earthy off-flavour in wine: Evaluation of remedial treatments for geosmin contamination, *Znanstveni članak, Elsevier Ltd.*
- López, R., Aznar, M., Cacho, J., Ferreira, V. (2002.) Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection, *Znanstveni članak, Journal of Chromatography A*, , stranice 167–177.
- Lu G, Edwards CG, Fellman JK, Mattinson DS, Navazio J.(2003.) Biosynthetic origin of geosmin in red beets (*Beta vulgaris L.*). *J Agric Food Chem.*:1026-9.
- Novak,P.,V. Allegretti Živčić.(2013.) Spektrometija masa(MS), sadržaj preuzet s [https://www.pmf.unizg.hr/download/repository/12\\_AK2\\_MS\\_krom.pdf](https://www.pmf.unizg.hr/download/repository/12_AK2_MS_krom.pdf) (26.06.2016.)
- Petrović, T.(2009.) Kvalitativne i kvantitativne analize metadona u biološkim uzorcima, *Diplomski rad, Split*, (28.06.2016.)
- Rayne, S., Eggers, N.J.(2008.) 4-Ethylphenol and 4-ethylguaiacol concentrations in barreled red wines from the Okanagan Valley appellation, British Columbia, *Znanstveni članak, American Journal of Enology and Viticulture.*
- Rendulić, I., Rubeša Vili, V., Puhelek, N. (2010.) *Vinogradarstvo i vinarstvo, Priručnik za polaganje ispita, Zagreb.*
- Ribéreau-Gayon, P. ; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D.(1998.) *Traite´ d’Oneologie. 2-Chimie du Vin. Stabilisation et traitements; Dunod: Paris, p 519.*

Sadoughi, N., Schmidtke, Leigh M., Antalick, G., Blackman, J. W., Steel, C.C.(2015.) Gas Chromatography–Mass Spectrometry Method Optimized Using Response Surface Modeling for the Quantitation of Fungal Off-Flavors in Grapes and Wine, Znanstveni članak, Znanstveni članak, Journal of agricultural and food chemistry, 2877–2885.

Silva, P. C.; Figueredo, M., J. J.; San Romão, M. V.(2000.) Cork taint in wine: Scientific knowledge and public perception-A critical review. Crit. Rev. Microbiol. 26, 147-162.

Tanner, H., Zanier, C., Buser, H. R. 2,4,6-Trichloroanisole(198.): Einedominierende Komponente des Korkgeschmacks. Schweiz. Z. Obst- Weinbau, 117, 97-103.

Varaždinac, A. (2015.) Bolesti i mane vina, diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, poljoprivredni fakultet u Osijeku,.

Weingart, G., Schwartz, H., Eder, R., Sontag, G. (2010.) Determination of geosmin and 2,4,6-trichloroanisole in white and red Austrian wines by headspace SPME-GC/MS and comparison with sensory analysis, Znanstveni članak, , Springer-Verlag.

#### **Internetske stranice:**

1. Web 1 [http://www.cedar-agro.hr/down/mane\\_vina.pdf](http://www.cedar-agro.hr/down/mane_vina.pdf) pristupljeno 12.06.2016.
2. Web 2 <http://www.malvasia-touristra.eu/tradicionalna-malvazija-istarska-lista/?lang=sl> pristupljeno 12.06.2016.
3. Web3 <https://commonchemist.wordpress.com/2014/08/12/geosmin> pristupljeno 19.06.2016
4. Web 4 <http://casopisvino.co.rs/tajne-vina/vino-za-pocetnike-iii> pristupljeno 19.06.2016.
5. Web 5 [http://web.expasy.org/spotlight/back\\_issues/035](http://web.expasy.org/spotlight/back_issues/035) pristupljeno 19.06.2016.
6. Web 6 <http://www.britannica.com/science/Streptomyces> pristupljeno 19.06.2016.
7. Web 7 <http://dailyodors.blogspot.hr> pristupljeno 19.06.2016.
8. Web 8 <http://chemcool.tumblr.com/post/25018704998> pristupljeno 19.06.2016.
9. Web 9 <http://www.chm.bris.ac.uk/motm/geosmin/geosminh.htm> pristupljeno 19.06.2016.
10. Web10 <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/w315605?lang=en&region=HR&gclid=CPnyubHI1MsCFYdAGwodBxMKPA> pristupljeno 24.06.2016.
11. Web 11 [https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/4-Ethylphenol,MDA\\_CHEM-821290](https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/4-Ethylphenol,MDA_CHEM-821290) pristupljeno 24.06.2016.
12. Web 12 <http://www.abgenternasyonel.com/ilac.php?dilkod=EN&ilacid=27&kat=bestnate-50-ec> pristupljeno 26.06.2016.
13. Web13 <http://www.vinogradarstvo.com/vinogradarstvo/bolesti-vinove-loze/112-siva-plijesan-vinove-loze-botrytis-cinerea> pristupljeno 24.06.2016.

14. Web 14 <https://winesignofindia.wordpress.com/2012/02/21/cork-taint-in-wine-produced-by-246-trichloroanisole-tca/closure3/> pristupljeno 28.06.2016.
15. Web15 <http://beherebrewing.blogspot.hr/2013/01/brettanomyces-fermentation-images.html> pristupljeno 06.07.2016.
16. Web16 [http://www.aromadictionary.com/articles/brettanomyces\\_article.html](http://www.aromadictionary.com/articles/brettanomyces_article.html) pristupljeno 06.07.2016.
17. Web17 <http://www.sigmaldrich.com/catalog/product/aldrich/398780?lang=en&region=HR> pristupljeno 09.07.2016.

## 9. ŽIVOTOPIS

Rođena u Splitu 25.02.1992. godine, Republika Hrvatska. Odrasla sam u Sinju.

Školovanje sam započela 1997. U osnovnoj školi „Marka Marulića“ u Sinju. Kroz sve razrede osnovne škole bila sam odlična učenica.

2007. godine započela sam svoje srednjoškolsko obrazovanje u srednjoj strukovnoj školi „bana Josipa Jelačića“ u Sinju smjer ekonomist. Na osnovi odličnog uspjeha tijekom srednjoškolskog obrazovanja i maturalnog rada dobila sam nagradu škole za odličan uspjeh i stekla srednju stručnu spremu ekonomski tehničar 2011. godine.

Na Zdravstveno veleučilište u Zagrebu, smjer sanitarno inženjerstvo upisala sam se 2011. godine, na kojem sam i završila svoje 3.godina stručnog preddiplomskog studija 2014. godine i stekla zvanje stručni prvostupnik sanitarnog inženjerstva.

Na magistarski studij Agroekologija smjer Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi na Agronomskom fakultetu upisala sam se 2014. godine. Tokom studiranja obavljala sam stručnu praksu na Zavodu za mikrobiologiju Agronomskog fakulteta, tijekom 2015.

Tijekom 2016. obavljanje stručne prakse za vrijeme studiranja u Zavodu za vinogradarstvo i vinarstvo, hrvatskog centra za poljoprivredu hranu i selo. Također u sklopu diplomskog rada pod vodstvom mentora razvila sam metodu za određivanje hlapivih spojeva odgovornih za negativne mirise u vinu uz primjenu kvantitativne plinsko kromatografske metode uz SPME(mikroekstrakcija na čvrstoj fazi) pripremu uzorka te naposljetku detekciju na masenom detektoru Saturn 2000 Varian.

### Dodatno obrazovanje:

Ostali jezici	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
Engleski	C1	B2	B2	B2	B2
Talijanski	A2	B1	B1	B1	B1

Stupnjevi: A1 i A2: Početnik - B1 i B2: Samostalni korisnik - C1 i C2: Iskusni korisnik

**Nagrade i priznanja:**

Stipendija grada Sinja za školsku godinu 2011./2012., 2012./2013., 2014./2015., 2015./2016.

**Posebna znanja i vještine :**

Poznavanje rada na računalu : Word, Excel, Access, Internet , PowerPoint.

Ambiciozna, vrijedna, susretljiva, volim timski rad, odgovorna, komunikativna, spremna na sve izazove vezane za zadani posao.