

Dr Dubravka Premužić  
i inž. Olga Šafar,  
Poljoprivredni fakultet, Zagreb

### STABILIZACIJA VINA POMOĆU DIETILESTERA PIROUGLJIČNE KISELINE

U novije vrijeme u svim vinarskim zemljama postoji tendencija da se u promet stavljaju buteljirana, mlada, svježa vina s manjim količinama neprevrelog šećera. Budući da takva vina lako podliježu naknadnom vrenju, to ih je prije stavljanja u boce potrebno stabilizirati. Biološka stabilizacija vina može se provesti mehaničkim putem, fizikalnim postupcima i upotrebom kemijskih sredstava. Najjednostavniji i najjeftiniji način biološke stabilizacije vina je primjena kemijskih sredstava, od kojih je do danas dozvoljen samo sumporni dioksid. Međutim SO<sub>2</sub> nije posve sigurno sredstvo za sprečavanje rada mikroorganizama u vinu. Ponekad i jače sumporena vina u bocama, ako tokom uskladištenja stoje na temperaturama prikladnim za razvoj kvasca, podliježu naknadnom vrenju. Uz to veće količine sumpornog dioksida negativno djeluju na okus vina a i na zdravlje potrošača. Nastoji se stoga pronaći sredstvo, koje bi sprečavalo razvoj mikroorganizama u buteljiranim vinima, koje ne bi mijenjalo organoleptičke osobine vina, a uz to bi bilo neškodljivo za konzumente.

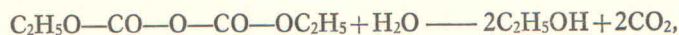
Posljednjih se godina vrše u mnogim zemljama intenzivna ispitivanja primjene dietilestera piro ugljične kiseline u svrhu biološke stabilizacije vina prilikom punjenja u boce.

Dietilester piro ugljične kiseline ili skraćeno DEP poznat je kao kemijski spoj još od 1938. godine.

Ruski autori Parfentiev i Kovalenko<sup>(1)</sup> pronašli su male količine dietilestera piro ugljične kiseline kao prirodne sastojke pjenušavih vina. Pretpostavili su, da bi taj ester mogao biti jedan od nosioca specifičnog šampanjskog okusa i utvrdili da djeluje toksički na kvasce.

Na osnovu tih prvih saznanja provedena su tokom 1955. godine ispitivanja u laboratorijima tvornice Bayer u Leverkusenu, gdje je potvrđeno da DEP djeluje mikrobicidno.

Tvornički proizveden DEP nazvan je Baycovin. Dietilester piro ugljične kiseline formule C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O—CO—O—CO—OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, bezbojna je tekućina sp. težine 1,12, koja vri kod 44<sup>0</sup> C i ima lagani miris na voćne estere. U vodi je praktički netopiv, lako se otapa u alkoholu i drugim organskim otapalima. Prema navodima tvornice, Baycovin dodan alkoholnim pićima ili voćnim sokovima, potpuno se raspada u vrlo kratkom roku, već nakon nekoliko sati na CO<sub>2</sub> i etilni alkohol, prema formuli:



dakle na sastojke koji se prirodno nalaze u alkoholnim pićima (vino, pivo) kao proizvodi alkoholnog vrenja. Svakako da je takvo sredstvo pobudilo veliki interes, pa se u gotovo svim vinorodnim zemljama provode ispitivanja prikladnosti DEP-a u svrhu biološke stabilizacije vina.

U literaturi s prikazima do sada provedenih pokusa o primjeni dietilestera (Hennig, Hecht, Koch, Thoukis i sur., van Zyl, Kiss i Sikerle, Kielhöfer, Minarik, Böhringer) navodi se, da se količine potrebne za eliminiranje mikrofloze vina kreću od 50 do 200 mg/1. Dietilester se dodaje vinu fino raspršen specijalnim raspršivačem ili u obliku alkoholne otopine. Prilikom dodavanja Baycovin djeluje na mikroorganizme letalno.

Treba ga primijeniti neposredno prije stavljanja vina u boce, jer bi radi brzog raspadanja njegovo djelovanje na mikrofloru bilo neefikasno ukoliko bi, nakon razgradnje sredstva, moglo doći do naknadne kontaminacije mikroorganizmima.

### VLASTITA ISTRAŽIVANJA

Aktuelnost problema biološke stabilizacije vina potakla nas je, da pristupimo ispitivanjima mogućnosti primjene dietilestera pirougljične kiseline u našim vinima.

Pokuse smo proveli u tri pravca:

1. ispitivanje duljine trajanja antiseptičnog djelovanja estera;
2. ispitivanje djelovanja DEP-a na razne vrste kvasaca i
3. ispitivanje promjena organoleptičkih osobina vina, prvenstveno okusa vina, utjecajem estera.

Ad 1. U boce sa steriliziranim grožđanim sokom (moštom) dodali smo po 300, 400, i 500 mg/1 Baycovina. Mošt je 24 sata nakon dodatka Baycovina cijepljen aktivnom kulturom kvasaca i to rasama: Maja, Hladni i 3/1 koje redovno dajemo u praksu kao čiste kulture. Nakon daljnjih 24 sata nastupilo je u svim bocama snažno vrenje, što je bio očiti dokaz da u tom moštu više nije bilo sredstava koje bi moglo toksički djelovati na kvasce, dakle da je u tom vremenu antiseptično djelovanje estera prestalo, odnosno da se ester razgradio. Nakon 14 dana u prvrelim smo vinima odredili količine alkohola i šećera. Utvrdili smo da nema nikakvog zaostatka šećera, vrenje je prema tome proteklo normalno bez ikakvih smetnji za kvasce.

Ad 2. Da ispitamo djelovanje estera na kvasce koji sačinjavaju tipičnu mikrofloru vina, inokulirali smo jedno slatko vino kvascima: *Saccharomyces vini*, *Saccharomyces oviformis*, *Saccharomyces carlsbergensis* i *Saccharomyces acidifaciens*. Od vrste *Saccharomyces vini* dodana su dva razna soja, jedan izoliran iz sjevernog (Plješivičkog) vinogorja, i jedan iz južnog vinogorja (poluotok Pelješac). Kvasci su dodavani u količinama od:

Sacch. vini (I)	131,8 x 10 <sup>6</sup> stanica
Sacch. vini (II)	124,4 x 10 <sup>6</sup> „
Sacch. oviformis	97,2 x 10 <sup>6</sup> „
Sacch. carlsbergensis	82,4 x 10 <sup>6</sup> „
Sacch. acidifaciens	120,0 x 10 <sup>6</sup> „

Da se odstrani prirodna mikroflora, vino je prethodno filtrirano. U seriji je inokulirano po 5 boca uz dodatak od 50, 100, 150 i 200 mg/1 Baycovina, koji je dodavan kao 10% alkoholna otopina. Paralelno su ostavljene kontrole bez dodatka estera.

Da ispitamo djelovanje estera na spontanu mikrofloru vina, dodali smo nefiltriranom vinu količine od 50, 100, 150 i 200 mg/l dietilestera. Ostavljene su također kontrolne boce bez dodatka estera.

Vina u pokusu čuvana su 6 mjeseci kod temperature 18—20°C. Nakon 6 mjeseci boce su otvorene i utvrđeno je slijedeće:

a) Svi kontrolni uzorci filtriranih i nefiltriranih vina potpuno su provreli, a isto tako i uzorci vina kojima je bilo dodano 50 mg/l Baycovina.

b) Uzorci nefiltriranog vina tretirani sa 100 mg/l Baycovina potpuno su provreli. U uzorcima filtriranog vina uz istu količinu estera vrenje je bilo samo djelomično provedeno dodatkom dodatkom kvasaca vrste Sacch. vini i Sacch. oviformis; uz dodatak Sacch. carlsbergensis vrenja nije bilo. U bocama sa 100 mg/l Baycovina inokuliranih sa Sacch. acidifaciens vino je bilo jako zamučeno uslijed snažnog razmnažanja kvasaca, a vrenje je bilo vrlo lagano.

c) Količina od 150 mg/l Baycovina nije mogla potpuno spriječiti razmnažanje i rad kvasaca iz spontane mikroflore vina, pa su se u vinu mogli primijetiti lagani mjehurići ugljičnog dioksida. Vina inokulirana uzgojenim rasama kvasaca ostala su uz dodatak 150 mg/l estera potpuno stabilna.

d) Dodatkom od 200 mg/l Baycovina potpuno je bio spriječen razvoj kvasaca iz spontane mikroflore vina.

Osim ispitivanja stabilnosti slatkih vina, načinili smo i pokus za ispitivanje stabilnosti suhih vina u bocama. Kod laganijih konzumnih vina punjenih u bocama, često se na površini vina razvijaju kvasci vinskog cvijeta. Kako je vinski cvijet vrlo neugodna pojava u vinu, željeli smo ispitati djelovanje Baycovina na kvasce koji redovno u našim vinima uzrokuju tu pojavu, a pripadaju rodovima Candida i Pichia. U tu smo svrhu inokulirali suho konzumno vino s kvascima vrsta Pichia membranefaciens ( $131 \times 10^6$ ), i Candida mycoderma ( $120 \times 10^6$ ) stanica. Estera smo dodavali u količinama 50, 100, 150 i 200 mg/l. Vina su pregledana nakon 6 mjeseci. U kontrolnim uzorcima ustanovljen je jak razvitak vinskog cvijeta, dok su količine od 50 mg/l gotovo sasvim spriječile razvitak kvasaca Candida i Pichia.

Ad 3. Da ustanovimo u kojoj mjeri utječe dodatak Baycovina na organoleptička svojstva vina, prvenstveno na okus, postavili smo pokuse sa dva slatkasta i jednim suhim vinom.

#### Sastav ispitivanih vina

	Bijeli burgundac 1962. god.	Bijelo stolno neprovrelo 1962. god.	Bijelo stolno 1962. god.
Spec. tež. (20/4)	1,0069	1,0037	0,9907
Alkohol vol %	12,00	11,23	10,88
Uk. ekstrakt g/l	61,2	52,6	17,8
Šećer (invert) g/l	33,5	34,0	1,0
Suhi ekstrakt g/l	28,7	19,6	17,8
Ukupne kiseline			
kao vinska g/l	6,26	4,87	5,32
Hlapive kiseline			
kao octena g/l	1,05	0,50	0,52

Dietilester pirougljične kiseline dodavan je u obliku 10% alkoholne otopine u količinama od 50, 80, 100, 150, 200 i 300 mg/l. Ostavljen je i određeni broj kontrolnih boca, koje su zatvorene bez dodatka estera. Prije dodatka Baycovina slatkasta su vina razdijeljena u dvije skupine: prva je skupina punjena u boce bez filtriranja, drugi dio je prethodno EK filtriran. Nakon provedenog filtriranja vinima je dodavan ester uz dobro miješanje.

Organoleptičko ocjenjivanje vina provedeno je nakon 3 i 6 mjeseci u prisustvu 8 vinarskih stručnjaka.

#### REZULTATI ORGANOLEPTIČKE OCJENE

U bijelom stolnom suhom vinu primijećene su vrlo izrazite promjene okusa i mirisa uz dodatak od 100 mg/l DEP-a.

Količine od 100 mg/l Baycovina nisu djelovale na promjenu okusa u bijelom stolnom neprovrelom vinu. Kod njega su promjene okusa nastupile u uzorcima kojima je bilo dodano 150 mg/l DEP-a.

Uz dodatak od 200 mg/l estera primijećene su u oba vina, iako ne u svim bocama, promjene boje. Vina su, naime, posmeđila.

Interesantni su rezultati organoleptičke ocjene bijelog burgunca, koji je stabiliziran s dietilesterom pirougljične kiseline.

Od nefiltriranih vina, kontrole i uzorci tretirani sa 50, 80 i 100 mg/l Baycovina bili su lagano maglušasti, dok su vina uz dodatak 150, 200 i 300 mg/l estera, te svi uzorci filtriranih vina bili kristalno bistri s vrlo lijepim sjajem. U svim bocama, kako nefiltriranih tako i filtriranih vina, nađen je lagani kristalični talog izdvojenog kalijeveg kiselog tartarata.

Bijeli burgundac je kod postavljanja pokusa imao zelenkastožutu boju. Prilikom ocjenjivanja nakon 6 mjeseci, primijećeno je da su uzorci tretirani sa 150, 200 i 300 mg/l Baycovina imali nešto izrazitiju žutu boju. Općenito se može reći, da većih razlika u boji između pojedinih tretiranja i kontrola nije bilo. Pojava posmeđivanja nije zapažena ni u jednom uzorku.

U okusu primijećene su razlike između kontrolnih vina i vina s dodatkom Baycovina. U kontrolnim bocama osim u EK filtriranim počelo je vrlo lagano vrenje. Vina su u vrenju bila nešto svježija i ugodnijeg okusa.

Nepromijenjeni okus zadržala su vina kojima je bilo dodano 50, 80 i 100 mg/l estera. Kod vina sa 150 i 200 mg/l dodanog Baycovina osjećao se slabije ili jače izražen strani miris. Vrlo neugodan strani miris i promijenjen okus zapažen je kod vina kojima je Baycovin dodan u količini od 300 mg/l.

Vrijedno je spomenuti, da se veće količine Baycovina dodane bijelom burguncu, koji je počeo vreti, nisu na okus osjećale. Serija boca bila je, naime, punjena bijelim burguncem u kojem je nastupilo naknadno vrenje i dodane su veće količine Baycovina, 150, 200, 300, 400, 500 i 600 mg/l. Vrenje je bilo potpunoma spriječeno dodatkom od 300 mg/l Baycovina, ali se na okusu nije osjećala niti količina od 500 mg/l.

#### DISKUSIJA

Prema navodima tvornice Bayer, dodani dietilester pirougljične kiseline morao bi se nakon 7 sati uz temperaturu od 20°C, odnosno nakon 18 sati kod temperature od 10°C potpuno raspasti na CO<sub>2</sub> i etilni alkohol. U pogledu brzine

hidrolitskog cijepanja estera mišljenja pojedinih autora se razlikuju. Hennig<sup>(2)</sup> navodi, da se DEP razgradi potpuno u roku od 10 sati. Prema rezultatima Hechta<sup>(3)</sup> u periodu od 8 sati razgrađeno je 85% estera. Lüthi<sup>(4)</sup> kao i Koch<sup>(5)</sup> sumnjaju u potpunu razgradnju DEP-a. Amerikanci Thoukis i suradnici<sup>(6)</sup>, radeći s označenim DEP C<sup>14</sup>, ustanovili su da se uz normalni aktuelni aciditet vina od pH3,3 hidrolizira 97—98% estera.

Našim pokusima sa steriliziranim grožđanim sokom nismo doduše ispitivali do koje je mjere ester bio razgrađen, ali smo ustanovili, da je nakon 24 sata prestalo njegovo mikrobicidno djelovanje. Smatramo, dakle da i veće količine estera nakon 24 sata ne djeluju više na rad mikroorganizama.

Ispitujući djelovanje Baycovina na kvasce vina, utvrdili smo da su količine od 200 mg/l toga estera dovoljne za sprečavanje razvitka bilo koje vrste kvasaca. Najosjetljivije vrste kvasaca bile su *Pichia membranefaciens*, *Candida mycoderma* i *Saccharomyces carlsbergensis*. Za sprečavanje razvitka sojeva tih vrsta u vinu, bile su dovoljne količine od 100 mg/l Baycovina.

Podjednaku otpornost prema djelovanju dietilestera pirougljične kiseline utvrdili smo za sojeve vrsta *Sacch. vini* i *Sacch. oviformis*; dodatkom od 150 mg/l estera bio je potpuno spriječen razvitak kvasaca tih vrsta.

Minarik i Laho<sup>(7)</sup> proveli su ispitivanja o djelovanju Baycovina na kvasce *Sacch. oviformis*, pa smatraju da se količinama od 150 do 200 mg/l estera može spriječiti razvitak kvasaca te vrste, što se uglavnom podudara s našim rezultatima.

Najpotpornije vrste kvasca prema djelovanju estera bio je soj *Saccharomyces acidifaciens*. Uz dodatak od 100 mg/l Baycovina bilo je vino inokulirano tim sojem mnogo jače zamučeno nego vina koja smo cijepili drugim vrstama kvasaca. Dodatkom 200 mg/l estera bilo je zaustavljeno razmnažanje i te vrste kvasaca. Schanderl<sup>(8)</sup> smatra vrstu *Sacch. acidifaciens* otpornom na dodatak od 200 mg/l dietilestera, dok van Zyl<sup>(9)</sup> navodi, da su tek količine od 750 mg/l estera djelovale letalno na tu vrstu. Ovako velike količine jakog antiseptičnog sredstva mogu vjerojatno podnijeti samo sporulirane stanice kvasca. Böhringer<sup>(10)</sup> sumnja u efikasnost djelovanja DEP-a u vinima u kojima se nalaze spore kvasaca. Naime, uslijed brzog hidrolitskog cijepanja estera, njegovo antiseptično djelovanje prestane prije nego što spore isključaju.

Pregledom naših vina prije spremanja u boce, nismo mogli primijetiti prisustvo ascospora u vinu. Smatramo, međutim, da je to svakako jedan vrlo važan faktor, na koji će trebati obratiti pažnju.

Rezultati naših ispitivanja o djelovanju DEP-a na spontanu mikrofloru vina, potpuno se podudaraju s pokusima Kissa i Sikerle<sup>11</sup>. Utvrdili smo naime, kao i mađarski autori, da je spontana mikroflora vina mnogo manje osjetljiva na dodatak antiseptičnog sredstva, nego kvasci dodani u čistim kulturama. Za potpuno suzbijanje prirodne mikroflore vina, u našim je pokusima bila potrebna količina od 200 mg/l estera.

Prema propisima tvornice i mišljenju autora Kielhöfera<sup>12</sup> Kocha i drugih, vina bi se prije dodavanja dietilestera morala EK filtrirati, da se potpuno odstrani prirodna mikroflora vina. Kako su u našim prilikama ograničene mogućnosti sterilnog punjenja, to su nam podaci o djelovanju DEP-a na spontanu mikrofloru vina bili naročito značajni.

U pogledu organoleptičkih osebina vina, kojima je dodan DEP, mišljenja pojedinih autora znatno se razlikuju. Prema Hennigovim<sup>2</sup> ispitivanjima, količine od 200 mg/l DEP, nisu djelovale na organoleptička svojstva vina. Lühi (cit. prema Kochu)<sup>5</sup> tvrdi, da se u voćnim sokovima nakon nekoliko mjeseci osjećaju strani mirisi uz količine od 50 mg/l. Kiss i Sikerle ispitali su djelovanje DEP-a u vinima raznih sorata. Prema njihovim rezultatima, kod vina s malo ekstrakta organoleptičke osebine ostaju nepromijenjene kod dodatka do 200 mg/l, a slatka vina s mnogo ekstrakta ne mijenjaju se ni dodatkom od 500 mg/l DEP-a.

Strani miris u vinima s dodanim esterom, koji većina autora spominje, mogao bi prema navodima Kielhöfera<sup>12</sup>, Kocha<sup>5</sup>, Thoukisa<sup>6</sup> i drugih, potjecati od pirokarbonat kompleksa, koji nastaju spajanjem dietilestera s nekim sastavnim dijelovima vina.

Naše pokuse dodavanja DEP-a suhim vinima u svrhu suzbijanja vinskog cvijeta upotpunili smo i organoleptičkom ocjenom tih vina. Ustanovili smo, da se u suhim vinima osjeća neugodan okus i miris već dodatkom do 100 mg/l estera.

Kod slatkastih vina količine do 100 mg/l DEP-a nisu utjecale na organoleptičke osebina vina. Dodatkom od 150 mg/l okus je u većini uzoraka vina bio nešto promijenjen, a jače promjene nastupile su dodatkom 200 i više mg/l estera.

Činjenica, da se kod slatkog bijelog burgunca, kojemu smo prekinuli vre-  
nje dodatkom velikih količina DEP-a, nisu osjećale u okusu i mirisu ni količine od 500 mg/l, ukazuje na veliku varijabilnost djelovanja Baycovina na organoleptička svojstva vina različite starosti, sastava i porijekla.

U toku pokusnog rada je primijećeno da u nekim vinima uz dodatak 200 i više mg/l Baycovina dolazi do posmeđivanja. Nismo mogli utvrditi koji je novonastali spoj uzrokovao tu pojavu, pa bi i u tom pravcu trebalo provesti dalja ispitivanja.

## ZAKLJUČCI

Na osnovu provedenih pokusa utvrdili smo, da količine od 100 do 200 mg/l dietilestera pirougljične kiseline djeluju antiseptično na mikrofloru vina.

U pogledu djelovanja DEP-a na organoleptička svojstva vina ustanovili smo, da je u suhim vinima došlo do promjene okusa i mirisa već kod dodatka od 100 mg/l estera. Kod slatkastih vina, okus je bio promijenjen uz dodavanje oko 150—200 mg/l dietilestera. U slatkim i ekstraktnim vinima nisu primijećene promjene organoleptičkih svojstava ni uz 500 mg/l dodanog estera.

Količine od 200 i više mg/l DEP-a uzrokovale su u nekim vinima promjene boje.

Smatramo stoga, da bi za donošenje konačnog mišljenja o primjeni dietilestera pirougljične kiseline u svrhu biološke stabilizacije naših vina, trebalo provesti daljnja ispitivanja s većim brojem vina različite kvalitete iz raznih vinorodnih područja.

## ZUSAMMENFASSUNG

Im Institut für Weinbau und Kellerwirtschaft der Fakultät für Landwirtschaft in Zagreb, hat man im Jahre 1963. Versuche mit Pyrokohlensäureäthylester — Baycovin — durchgeführt. Durch Versuche ist die Wirkung des PKE auf Hefen und auf die organoleptischen Eigenschaften der Weine geprüft.

In filtrierten mit Heferassen inokulierten Weinen genügte die Menge von 100 mg/l PKE als gärhemmendes Mittel.

Fungizide Wirkung des Esters in unfiltrierten Weinen ist erst mit 150—200 mg/l bemerkbar.

Stark mit Hefen kontaminierte, angegorene Weine vertragen geschmacklich grosse Dosen PKE.

Die Versuche werden mit den Weinen aus diversen Weingegenden fortgesetzt, weil man vermuten kann, dass volle, extraktreiche Weine geschmacklich weniger empfindlich an PKE sind, als dünne, extraktarme Weine.

## LITERATURA

1. Parfentiev, L. N. i Kovalenko V. I.: Vinod. i vinogr. SSSR, 3, 1951.
2. Hennig K.: Weinberg u. Keller, 9, 1960., 7, 1961., 8, 1962.
3. Hecht G.: Z. Lebensm. Untersuchg. u. Forschg. 114/4, 1961.
4. Lüthi H.: cit. prema Kochu, W. u. K. 9, 1962.
5. Koch J.: W. u. K. 9, 1962.
6. Thoukis G., i sur.: Am. J. c. Enology s. vit. 3, 1962.
7. Minarik E. i Laho L.: Kvasny primysl. 4, 1962.
8. Schanderl H.: W. u. K. 3, 1963 (ref).
9. Van Zyl J. A.: W. u. K. 3, 1963 (cit. prema Schanderlu).
10. Böhringer P.: Die Hefen, Weinhefe u. Weinbereitung Nürnberg 1962.
11. Kiss I. i Sikerle B.: W. u. K. 2, 1964. (ref).
12. Kielhöfer E.: W. u. K. 7, 1962.