

## The Electrodialysis of Wine Using Ion-selective Membranes

Moto-o KAGAMI

(Received 10 October 1958)

加賀美元男：ブドウ酒のイオン交換膜による処理について

### INTRODUCTION

The study of the influence of various ions to the quality of wine has been of considerable interest for many years. It is now well known that the quality of wine is markedly influenced by the presence of some ionic substances.

Recently there has been aroused considerable interest in the use of ion-selective membranes for the separation of electrolytes from nonelectrolytes or from one another. The introduction of ion-selective membranes for the electrolytic deionization of water of high salt content employing multicompartment cells (fifty or more membranes) suggested the use of these membranes for the stabilization of wine. However, it must be emphasized that desalting by electrodialysis using ion-selective membranes is still in an early stage of development.

The object of this experiment is to determine the usefulness of the ion-selective membranes for stabilizing and deacidifying wines. The behavior of some typical ions in the wine was investigated in the two kinds of membranes produced by the different manufacturers.

### EXPERIMENTAL

#### I. *Materials*

##### 1) Wines

The typical samples furnished for this experiment are as follows :

(a) *Dry White Wines.* Dry white wine (K) made from the Koshu grapes produced in Katsunuma, Yamanashi Pref., Japan in 1953.

Dry white wine (GQ) made from the Golden Queen grapes produced in Zenkoji, Yamanashi Pref., Japan in 1955.

(b) *Dry Red Wines* Dry red wine (BA) made from the Muscat Bailey A grapes produced in Katsunuma, Yamanashi Pref., Japan in 1954.

Dry red wine (BQ) made from the Black Queen grapes produced in Katsunuma, Yamanashi Pref., Japan in 1955.

##### 2) Membranes

The ion-selective membranes used in this experiment were Nalfilm, the anion-

permeable membrane, and Nalfilm C of the cation-permeable type, manufactured by the National Aluminate Corporation, and Amberplex A and C which were made by the Rohm & Hass Company, Philadelphia, Pa. U. S. A.

## II. Apparatus and Procedure

### 1) Electrolytic cell

The experiments in the removing undesirable components from wine by electro dialysis were carried out in an apparatus having three compartments separated by ion-selective membranes (Fig. 1).

The wine compartment is separated from the anode compartment by an anion-permeable membrane and from the cathode by a cation-permeable membrane. Electrodes were placed in the outer compartments, and on passing an electric current the ions in the middle compartment moved towards these electrodes, thus lowering the electrolyte content of the wine in that compartment and correspondingly enriching the electrolyte content in the electrode compartments. Liquids are prevented from entering the wrong compartments by joining together the two membranes bounding the compartment to make a watertight joint round the channel.

When the cell is in operation, the anions of the wine are displaced into the adjacent compartment on the anode side and the cations into the adjacent compartment on the cathode side.

The electrode compartments are  $8.5 \times 7.5 \times 1.8$  cm. and the wine compartment is  $8.5 \times 7.5 \times 0.8$  cm. A carbon rod was used as a cathode, and a thin sheet of platinum foil serves as an anode. The surface area of the cathode is about 12 sq. cm. and the anode area is 48 sq. cm.

### 2) Operation of cell

About 50 ml. of wine are added to wine compartment and 100 ml. of 0.02 per cent sodium chloride solution are placed in each of the electrode compartment.

The initial amperage was about 700 ma. and initial voltage about 40 v. Changes in amperage and voltage reading were recorded every 10 min, and the power

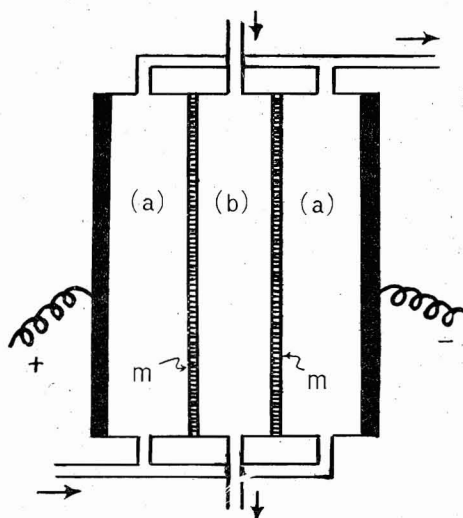


Fig. 1. Schematic Representation of an Apparatus for Removal of Undesirable Component from Wine in a Three Compartment Electro dialysis Cell containing Ion-selective Membranes.

a, Inert solution ; b, Middle chamber : Wine ; m, Anion and Cation permiable membrane.

consumption was calculated by measuring the area under a Watt-time curve.

### 3) Analytical methods

The amounts of reducing sugar in the wine were determined before and after electrolytic treatments by the method of Bertrand, and ethanol by pycnometer.

The pH value was measured with the glass electrode, the titratable acidity by titration with standard sodium hydroxide to the end-point of phenolphthalein used externally, and the volatile acid content by the steam-distillation method of the Association of Official Agricultural Chemists <sup>1)</sup>. Calcium and magnesium contents were determined by E. D. T. A. titration with "Eriochrome black T" and "Dotite MX" as the indicators and potassium cyanide <sup>2)</sup>. Iron was determined directly in the wine <sup>3)</sup>, and copper by the colorimetric method using S. D. D. C. reagent <sup>4)</sup>.

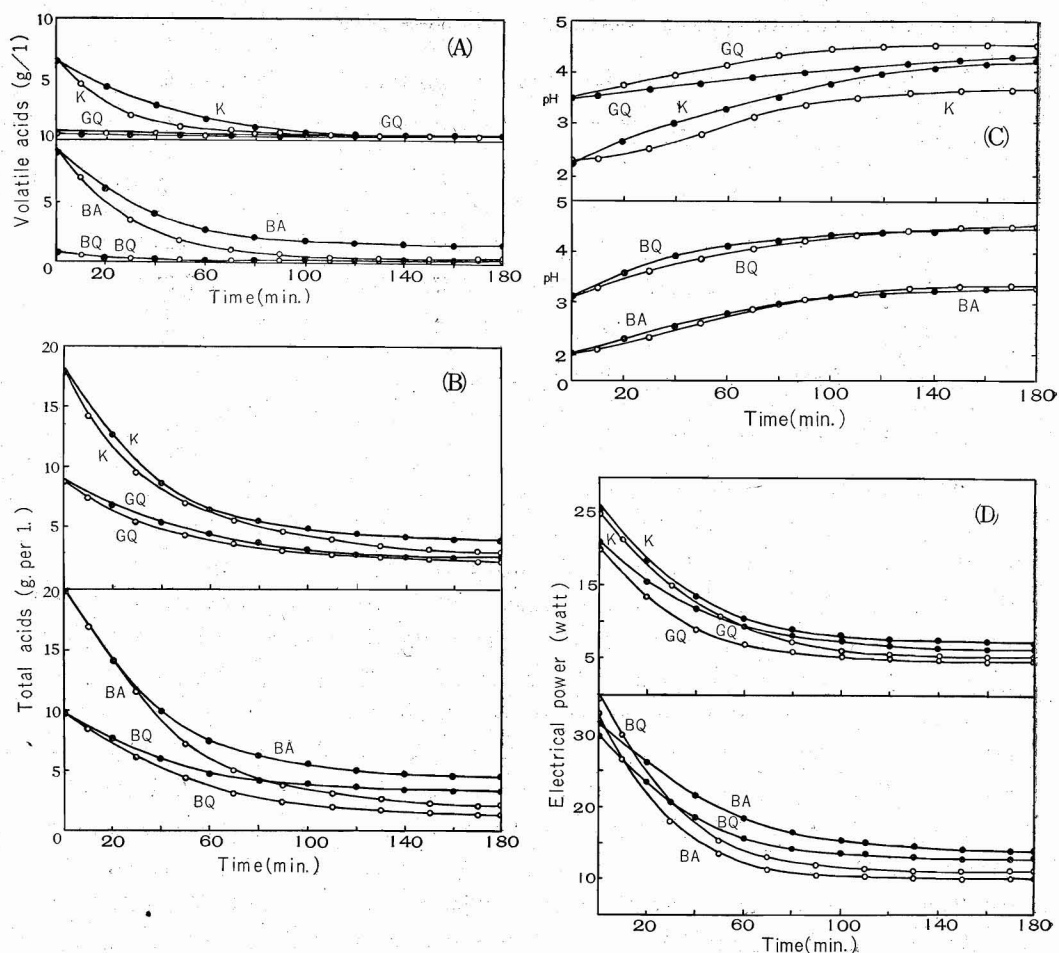


Fig. 2. Changes in Volatile acidity (A), Total Acidity (B), pH (C), and Electrical Power (D) during the Electrolytic Treatment with Nalfilm (○—○) and Amberplex (●—●).

## RESULTS AND DISCUSSION

The changes of acidity during the electrolytic treatment are shown in a general diagram (Fig. 2).

The pH values and the total and volatile acid contents were determined at regular intervals during the process of the electrodialysis, and both membranes brought about the increase in the pH and decrease in the acidities of the wine with considerable improvement in palatability. The acidity of the wine can be controlled at will by regulating the degree of electrolytic treatment.

These experimental results were found to occur in almost all experiments when the membranes were in the system referred to above.

The effect of concentration in salt cell on electrical power consumption has also been shown in the present work by the following experiment.

TABLE 1 *Effect of Salt Cell Concentration on Power Consumption*

		Experiment No.		
		1	2	3
Final amperage	(ma.)	310	300	320
Total acidity of the Wine <sup>a)</sup>	(g/l)	7.57	7.32	7.81
Power consumption	(kw.-hr.)	0.018	0.023	0.028
Time of electrodialysis	(min.)	45	50	75

a) As tartaric acid.

Three equal volumes of wine were electrodialyzed without changing the solution in the salt cells. The data in TABLE I show that in order to get the same degree of deacidification, the power requirement will increase in proportion to the salt cell concentration. For the first volume of wine, 0.018 kw.-hr. was required to reduce the amperage to 310 ma. For the second volume, 0.023 kw.-hr. was required to give a final amperage of 300 ma., and for the third volume, 0.028 kw.-hr. was required to reduce the amperage to 320 ma. These values for final amperage correspond to a total acid content in the wines of 7.57, 7.32, and 7.81 g/l, respectively. The times required to obtain the final amperage in each case were 45, 50, and 75 min., respectively. Therefore, an economy in time as well as in electrical power is achieved by keeping the salt cell concentration at a minimum value.

The removal of the main cations in the wine was also studied. The efficacy of the membranes in removing these cations was tested by determining the metal content of the wines before and after electrodialysis, and the experimental details and analytical results are given in TABLE II and III.

TABLE II *Operation Conditions on the Electrodialysis of Wines*

Wine	Volume used	Amperage		Voltage		Total power consumed	Time elec- trolyzed
		Max.	Min.	Max.	Min.		
	ml.	ma.		v.		kw.-hr.	min.
Nalfilm	White wine (GQ) 50	560	300	44	42	0.013	40
	Red wine (BQ) 53	750	350	44	40	0.015	45
Amberplex	White wine (GQ) 52	600	370	44	40	0.017	50
	Red wine (BQ) 50	700	420	42	40	0.020	50

TABLE III *Analyses of the Wines Obtained by the Electrodialysis Using Ion-selective Membranes*

Wine		Alc.	T. A. <sup>a)</sup>	V. A. <sup>b)</sup>	R. S. <sup>c)</sup>	Fe	Cu	Ca	Mg	pH	
		Vol. %	g/l.			mg/l.					
Nalfilm	GQ	before	13.8	8.8	0.5	5.5	21.3	15.1	195.0	80.3	2.5
		after	13.7	4.8	0.1	5.3	1.5	2.3	58.5	27.5	4.0
		diff.	0.1	4.0	0.4	0.2	19.8	12.8	136.5	53.0	0.5
	BQ	before	12.2	9.8	0.8	7.8	18.1	35.2	122.8	70.1	3.2
		after	12.2	5.2	0.2	7.7	1.5	6.1	50.7	23.5	3.8
		diff.	0	4.6	0.6	0.1	16.6	29.1	72.1	46.6	0.6
Amberplex	GQ	before	13.8	8.8	0.5	5.5	21.3	15.1	195.0	80.3	3.5
		after	13.5	4.7	0.2	5.5	2.0	3.3	68.8	30.7	3.8
		diff.	0.3	4.1	0.3	0	19.3	11.8	126.2	49.9	0.3
	BQ	before	12.2	9.8	0.8	7.8	18.1	35.2	122.8	70.1	3.2
		after	12.0	5.5	0.2	7.5	2.0	8.7	72.8	37.0	4.0
		diff.	0.2	4.3	0.6	0.3	16.1	26.5	50.0	33.1	0.8

a) Total acids as tartaric, b) Volatile acids as acetic, c) Reducing sugars as glucose.

Although the membranes all treated similar cell-volumes of wine and produced similar chemical changes in the wine, the Nalfilm brought about a greater removal of the cations than the Amberplex, and iron appeared to be removed to a greater extent than copper. Of the cations, iron was removed in the largest amount (93 per cent), followed by copper (85 per cent), and Calcium (70 per cent). The treated and untreated wines were also analysed for ethanol and reducing sugar,

but the electrodialysis did not alter the amounts of these constituents, and the power requirement to deionize 50 ml. of wine was about 0.015 kw.-hr.

In this experiment it has been found that the electrodialysis using the ion-selective membranes is not detrimental to the flavour—in many cases the wine appears to have improved in organoleptic characters.

### SUMMARY

- 1) Two samples of dry wines (white and red) were treated in the electrodialysis using the two kinds of ion-selective membranes, Nalfilm and Amberplex.
- 2) The effects of the treatment were to raise the pH of the wine, to decrease the titratable acidity, and to reduce the amounts of calcium, magnesium, iron, and copper in the wine.
- 3) The electrodialysis is not detrimental to the flavour of wine.
- 4) The economy as well as in electrical power is achieved by keeping the salt cell concentration at a minimum value.
- 5) It appeared that Nalfilm ion-selective membranes are more suitable for obtaining excellent wine.

### ACKNOWLEDGMENTS

The author wishes to express his sincere appreciation to Prof. Y. OHARA of the Faculty of Engineering, Yamanashi University for his constant guidance and encouragement, and to Prof. H. P. GREGOR of the Polytechnic Institute of Brooklyn, New York for kindly furnishing some ion-selective membranes and for valuable advice.

### LITERATURE CITED

- 1) *Official and Tentative Methods of Analysis* of the A. O. A. C. 7th Ed. Washington (1950)
- 2) UENO, K. : *Chelatometry*, Nankodo, Tokyo (1956)
- 3) RIBEREAU-GAYON, J. : *Ann. Falsi. f.*, **26**, 297 (1933) ; *P. V. Soc. Sc. Phys. Nat. Bordeaux*, **33**, 121 (1932) ; *Analyse et controle des vins*. Polytechnique, Paris (1951)
- 4) AULT, R. G., E. J. HUNDSON and A. G. R. WHITEHOUSE : Determination of copper in Hops and Beer. *J. Inst. Brew.* **61**, 39, (1955)

## ブドウ酒醸酵中の酵母について

(第3報) 果醪中における亜硫酸の殺酵母作用

小原巖, 野々村英夫, 湯目英郎\*

(昭和33年10月15日受理)

### Dynamic Aspect of Yeast-flora during Vinous Fermentation

#### Part 3. Effect of Sulfiting or Alcohol Addition on Yeasts in Grape Musts

By Yuwao OHARA, Hideo NONOMURA, and \*Hideo YUNOME

It was found that the wild yeast groups including Apiculate yeasts (A), *Torulopsis bacillaris* type (T) and Kahm yeast group (K) disappeared immediately after the addition of 150 ppm of sulfur dioxide (Must No. 3), whereas there was little difference of the yeast flora between the must sulfited with 75 ppm of sulfur dioxide (No. 2) and the unsulfited must (No. 1).

Six volume percent of alcohol added to the fresh juice inhibited the development of the A-group (*Kloeckera apiculata*) effectively, but of T-group only slightly (Fig. 3, No. 7).

On the other hand, however, it was a remarkable fact that the number of viable cells of the true wine yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) decreased according to the amount of sulfur dioxide added prior to pitching: more than eighty per cent of the total cells died in the must sulfited with 150 ppm of sulfur dioxide, and more than ninety five percent with 200 ppm, though the damage was slight with 75 ppm.

ブドウ酒の醸造では原料を完全に殺菌せず, 野生酵母の付着したままのブドウを仕込むのが普通である。従って醸酵中の果醪からは当然各種の酵母が分離される。著者らは先きに果醪中の主要酵母の割合を測定した際, 同時にそれら分離株の亜硫酸に対する耐性について試験し, 野生酵母の増殖を実際的に阻止するには  $\text{SO}_2$  130 ppm 以上を添加することが必要であろうと推定した<sup>1)</sup>。

亜硫酸は元来ブドウ酒の醸造において, その殺菌作用と同時に還元力のある点が巧みに応用されているもので, 現在でもまだ総ての点で亜硫酸に代用することの出来るものがないようである。従って果醪における亜硫酸の効用に関する研究は多いが, それが果醪中の主要酵母群の消長に及ぼす影響については, 未だほとんど明らかにされていない, これらの問題はブドウ酒醸造を微生物学的に管理する上に, 基礎的資料となるものであるから,

\* 株式会社寿屋研究部



著者らは前報<sup>1)</sup>に引き続き今回は  $\text{SO}_2$  0~200 ppm を添加した果醪で、醗酵経過中の主要酵母群の生菌数を測定して亜硫酸のブドウ酒酵母及び野生酵母に対する殺菌効果を比較試験した。なお野生酵母の増殖を抑制する他の一因子であるアルコールを醗酵開始前に添加した場合についても亜硫酸と同様比較試験したので、それらの結果を報告する。

### 供 試 果 醪

昭和 32 年 (1957) 度山梨県勝沼産の甲州種ブドウを 10 月下旬に採取し、常法により除梗破碎した後、軽く圧搾して得られた果汁をよく混和し、その 20 l 宛を TABLE I のように 7 区に区分して仕込みをした。

TABLE I 仕込区分 Vinification Records

区 分 No.	果 汁 Fresh <sup>a)</sup> juice	糖 量 Sugar added	生成酒精(予想) Alcohol <sup>b)</sup> (probable)	亜硫酸添加 Sulfiting <sup>c)</sup> $\text{SO}_2$	酵母添加 Starter	(酵母数) (Yeast cells)
	<i>l</i>	<i>g/l</i>	<i>vol. %</i>	<i>ppm</i>	<i>ml</i>	$\times 10^6 \text{ per } ml$
1	20	230	(13.6)	0	400	(0.8)
2	20	230	(13.6)	75	400	(0.8)
3	20	230	(13.6)	150	400	(0.8)
4	20	230	(13.6)	75	- <sup>d)</sup>	(90)
5	20	230	(13.6)	150	- <sup>d)</sup>	(80)
6	20	230	(13.7)	200	- <sup>d)</sup>	(100)
7	20	152	(6.0 <sup>e)</sup> +9.0)	0	400	(0.8)

a) Koshu (Katsunuma); b) After BENVENIGNI et al.; c) With  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ; d) All yeasts obtained from the must No. 1~3 was reused respectively; e) Added to the fresh juice.

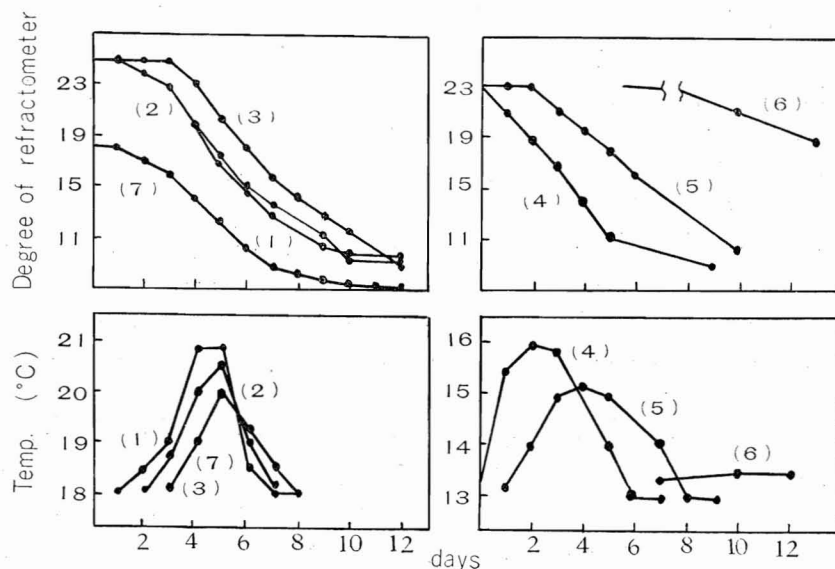


Fig. 1. Changes in Degree of Refractometer and Temperature during Fermentation of Musts.



果汁の直接還元糖分(ブドウ糖として)は  $152 \text{ g/l}$ , 総酸(酒石酸として)は  $7.5 \text{ g/l}$  であった。酵母は *Saccharomyces cerevisiae* (OC-2) を殺菌果汁に純粹培養したものを使用した。No. 1, 2, 3 の3区には亜硫酸を, No. 7 区にはアルコールを添加したあと, 数時間後に酵母として添加し, その増殖及び野生酵母の消長を観察した。No. 4, 5, 6 の3区は亜硫酸を加えたあと低温室 ( $5^{\circ}\text{C}$ ) に貯蔵し No. 1, 2, の主醸酵が終了した時, 沈降した全酵母をそれぞれ別に添加して再使用しブドウ酒酵母の亜硫酸による死滅と増殖の状態を観察した。

各試験区の醸酵経過は 24 時間毎に品温及び糖濃度を測定(屈折計による)し Fig. 1 に示した通りである。亜硫酸を添加した果醪では醸酵がおくれ最高品温も低くなっているが  $\text{SO}_2$  75 ppm 添加のもの (No. 2) は無添加のもの (No. 1) と大差は認められない。

## 実験及び考察

### 1. 全酵母生菌数の測定

果汁寒天の平板培養法により, 果醪  $1 \text{ ml}$  中の生菌数を測定し, 主醸酵期間 (10 日間) の増殖状態を Fig. 2 に図示した。

$\text{SO}_2$  150 ppm 及びアルコール 6 vol. % を添加した果醪は醸酵経過が1日位おくれるが, 対照醪と同様に果醪の糖分が約 10% 位消費される頃(仕込後数日)その最高生菌数に達し, いずれも  $0.9$  億/ $\text{ml}$  内外であった。補糖をしなかった果醪 (No. 7) も全酵母数はその他のものと同程度であったので酵母数を最高まで増殖させる糖分は果汁中 (15%) に既に必要以上含まれていたものと解される。またこの果醪 (No. 7) では, 最高生菌

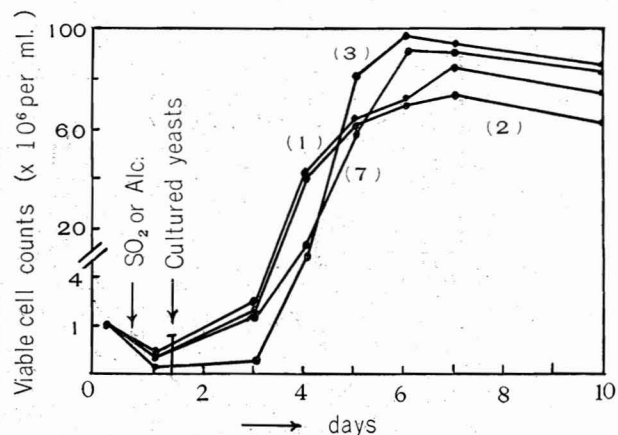


Fig. 2. Effect of Sulfiting or Alcohol Addition on the Viable Cell Counts during Fermentation of Musts.

数に達した時果醪中のアルコール濃度は, その他の果醪の場合より数%高くなっている。ので, 果醪中の酵母の増殖停止時期は単に蓄積されたアルコール濃度によって決定されているものではないと考えられる。

このように最高生菌数には各区共大差がみられないのであるが, 亜硫酸添加直後の生菌数をみると,  $\text{SO}_2$  75~150 ppm を添加した果醪ではその殺菌効果が認められ, 野生酵母の亜硫酸による淘汰もこの時期にみられた。

### 2. 亜硫酸またはアルコール添加と果醪中の野生酵母

供試果醪 (No. 1, 2, 3, 7) について醸酵経過中前報<sup>1)</sup>と同様にして酵母を分離し, それらを *Saccharomyces* (S), *Apiculate yeasts* (A), *Kahm yeasts* (K), *Torulopsis bacillaris*

type (T) 及びその他 (O) の5群に大別した。次にこれら各群の分離される頻度と、その時期における全酵母生菌数から各野生酵母群の生菌数を算出した結果は Fig. 3 のようになった。

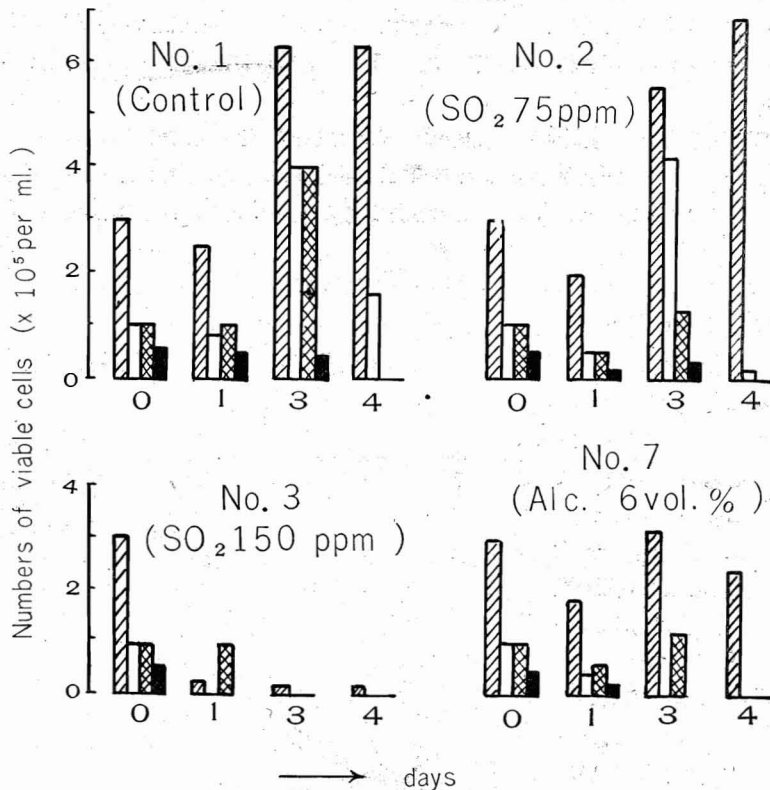


Fig. 3. Effect of sulfiting or Alcohol Addition on Various Wild Yeast Groups in Fermenting Musts. ■, T; □, A; ▨, K; ■, other non-Sacch. yeast group (O).

亜硫酸無添加のもの (No. 1) では仕込後3日目頃 (酒精分1°) に野生酵母の増殖が最高に達し約 150万/ml となった。その内容はT群のものが最も多く、次いで、A、K群共ほぼ同じ程度に増殖し、O群は増殖していない。4日後にはK、O群共に消滅しA群も半分以下になっているのに対しT群はほとんど死滅していない。

SO<sub>2</sub> 75 ppm 添加のもの (No. 2) では野生酵母の増殖が多少阻止されているが、No. 1と同様に仕込3日後に最高になり各野生酵母群共増殖している。4日後にはO群のものは死滅し矢張りT群が残るが、対照区と比較するとA群が早く消滅していることがわかる。

SO<sub>2</sub> 150 ppm 添加のもの (No. 3) ではもはやいずれの野生酵母群にも増殖は見られなかった。

アルコールを 6 vol. % 添加したもの (No. 7) では酒精分に対する耐性の強いT群のものが僅かに増殖するがA群もO群も3日後にはみられなかった。

前報では主として分離株による耐性試験とその分布状態から、自然の flora と差をつけるには  $\text{SO}_2$  130 ppm 以上を添加することが必要であろうと推定したが今回の実験では  $\text{SO}_2$  150 ppm を加えたもの (No. 3) では、野生酵母が完全に殺菌されていた。

今回の場合の A 群は *Kloeckera apiculata* ばかりであったため A 群は亜硫酸及び特にアルコールに対して T 群より著しく弱いわけであるが、若し *Kl. magna* 等が多ければ A 群もこの場合よりも多く生き残るものと考えられる。なお S 群としたものの中には *Saccharomyces rosei* の他 *Sacch. oviformis* も含まれ前者は最初に数%の割合で存在し4日後から見られなくなったが  $\text{SO}_2$  150 ppm 添加果醪では最初から分離されなかった。後者は主醸酵の終わった酒から分離されるが実際主醸酵にどの程度関与しているかは問題である。概して言えば *Torulopsis bacillaris*, Apiculate yeasts, Kahm yeasts, *Sacch. rosei* 等が最初優性であるが、その割合は *Sacch. cerevisiae* の増殖のみが圧倒的であるため、それに比較すればその他のものの増殖は極めて少なく、 $\text{SO}_2$  を 150 ppm 程度果汁に加えれば事実上、最初から *Sacch. cerevisiae* (酵母及び果房よりの) 単一種によって醸酵されるようになる。

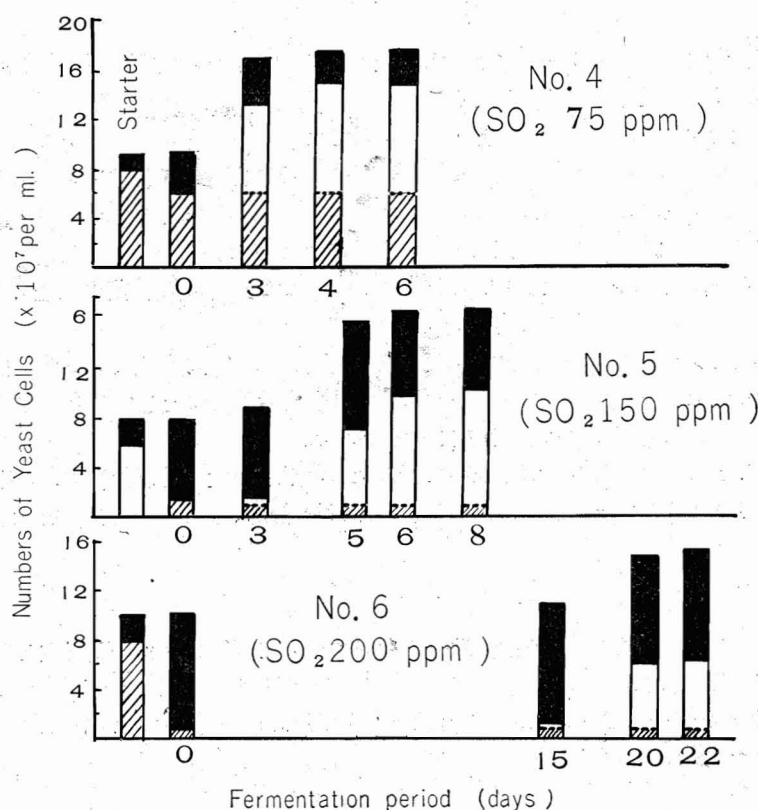


Fig. 4. Effect of Sulfiting on True Wine Yeasts in Musts.  
 ■, dead ; ■, survived ; □, newly propagated cells.

## 3. 亜硫酸のブドウ酒酵母に対する影響

供試果醪 No. 4, 5, 6 はそれぞれ No. 1, 2, 3, の主醸酵の終わった酵母を全部加えて再使用し, 最初から多量の酵母量 (0.7~1億/ml) を添加したものである。その酵母はほとんど最初から *Sacch. cerevisiae* であったが No. 4 ( $\text{SO}_2$  75 ppm) では, その約 25% が, No. 5 ( $\text{SO}_2$  150 ppm) では 80% 以上が, No. 6 ( $\text{SO}_2$  200 ppm) では 95% 以上が亜硫酸処理のため死滅した, 即ち野生酵母を実際上消滅させる  $\text{SO}_2$  の濃度 (150 ppm) では酒母として接種した *Saccharomyces* もその亜硫酸のため, 意外に多数死滅することが判明した (Fig. 4)。

なお接種酵母の生菌数の多いもの (No. 4) と少ないもの (No. 5) とでは, その増殖によって到達した最高生菌数 (1.5億/ml, 1億/ml) には差が認められるが, 果醪中で新しく増殖した酵母数には大差が認められず, その量も 0.9億/ml 位で, 酒母添加量の少ない場合 (No. 1~3) と大体同じ程度である。即ち普通果醪中で増殖する酵母の最高生菌数は, その接種量, 亜硫酸, 補糖, アルコール添加 (数%), 増殖終期におけるアルコール濃度等により増減することは余り認められなかった。

## 要 約

果汁に亜硫酸またはアルコールを添加し, その醸酵中の酵母を群別に分類したあと, それぞれ各群についてその消長を観察した。

1) 亜硫酸を  $\text{SO}_2$  150 ppm 程度加えた果醪では *Torulopsis bacillaris*, Apiculate yeasts, Kahm yeasts, *Saccharomyces rosei* 等の果房に優性な各群はいずれも事実上完全に殺菌され, 増殖しなかった。 $\text{SO}_2$  75 ppm では Apiculate yeasts が多少減少するが, 全般的に亜硫酸無添加の対照区と大差がみられなかった。

2) アルコールを 6 vol. % 添加した場合は Apiculate yeasts の殺菌は完全であったが *Torulopsis bacillaris* はかなり生き残った。

3) 亜硫酸を  $\text{SO}_2$  150 ppm 添加した場合, 野生酵母は完全に殺菌されるが, 同時に酒母として接種した *Saccharomyces cerevisiae* の生菌数も大巾 (80% 以上) に減少し,  $\text{SO}_2$  200 ppm では 95% 以上が増殖能力を失なった。

4) 酒母として接種した酵母が果醪中で新たに増殖する量 (酵母数) は, 増殖終止期までに蓄積されたアルコール濃度, 補糖量, 酒母添加量によっては直接影響を受けなかった。

## 文 献

- 1) 小原巖, 野々村英夫: ブドウ酒発酵中の酵母について (第2報) 分類固定と醸造学的性質, 農化, 30, 524 (1956)
- 2) BENVIGNIN, L., E. CAPT et G. PIGUET: *Traité de vinification*. 2 ed. Payot, Lausanne (1951)