

ZUBÍA

REVISTA DE CIENCIAS

MONOGRÁFICO

30

ier

Instituto de Estudios Riojanos

ZUBÍA. MONOGRÁFICO
REVISTA DE CIENCIAS,
Nº 30 (2018). Logroño (España).
P. 1-573, ISSN: 1131-5423

DIRECTORA

Patricia Pérez Matute

CONSEJO DE REDACCIÓN

Luis Español González
Rubén Esteban Pérez
Rafael Francia Verde
Juana Hernández Hernández
Alfredo Martínez Ramírez
Luis Miguel Medrano Moreno
Ana María Palomar Urbina
Ignacio Pérez Moreno
Enrique Requeta Loza
Purificación Ruiz Flaño
Angélica Torices Hernández

CONSEJO CIENTÍFICO

José Antonio Arizaleta Urarte
(Instituto de Estudios Riojanos)
José Arnáez Vadillo
(Universidad de La Rioja)
Susana Caro Calatayud
(Instituto de Estudios Riojanos)
Eduardo Fernández Garbayo
(Universidad de La Rioja)
Rosario García Gómez
(Universidad de La Rioja)
José M^a García Ruiz
(Instituto Pirenaico de Ecología)
Javier Guallar Otazua
(Universidad de La Rioja)
Teodoro Lasanta Martínez
(Instituto Pirenaico de Ecología)
Joaquín Lasierra Cirujeda
(Hospital San Pedro, Logroño)
Luis Lopo Carramiñana
(Dirección General de Medio Natural del Gobierno de La Rioja)
Fernando Martínez de Toda
(Universidad de La Rioja)
Juan Pablo Martínez Rica
(Instituto Pirenaico de Ecología-CSIC)
José Luis Nieto Amado
(Universidad de Zaragoza)
José Luis Peña Monné
(Universidad de Zaragoza)
Félix Pérez-Lorente
(Universidad de La Rioja)
Diego Troya Corcuera
(Instituto Politécnico y Universidad Estatal de Virginia, Estados Unidos)
Eduardo Viladés Juan
(Hospital San Pedro, Logroño)
Carlos Zaldívar Ezquerro
(Dirección General de Medio Natural del Gobierno de La Rioja)

DIRECCIÓN Y ADMINISTRACIÓN

Instituto de Estudios Riojanos
C/ Portales, 2
26071 Logroño
publicaciones.ier@larioja.org

Suscripción anual España (1 número y monográfico): 15 €

Suscripción anual extranjero (1 número y monográfico): 20 €

Número suelto: 9 €

Número monográfico: 9 €

INSTITUTO DE ESTUDIOS RIOJANOS

ZUBÍA

REVISTA DE CIENCIAS

30 AÑOS DE INVESTIGACIÓN EN LA RIOJA

Monográfico Núm. 30



Gobierno de La Rioja
Instituto de Estudios Riojanos
LOGROÑO
2018

Treinta años de investigación en La Rioja: Homenaje a Ildefonso Zubía e

Icazuriaga / -- Logroño : Instituto de Estudios Riojanos, 2018

573 p. : gráf. ; 24 cm-- (Zubía. Monográfico, ISSN 1131-5423; 30).-

D.L. LR 413-2012

1. Rioja – Política científica. 2. Zubía e Icazuriaga, Ildefonso – Homenajes I.

Instituto de Estudios Riojanos. II. Serie

061.61(460.21)(091)

001.891:32(460.21)"19/20"

63:061.62(460.21)

929 Zubía e Icazuriaga, Ildefonso

Reservados todos los derechos. Ni la totalidad ni parte de esta publicación pueden reproducirse, registrarse o transmitirse por un sistema de recuperación de información, en ninguna forma ni por medio, sea electrónico, mecánico, fotoquímico, magnético o electroóptico, por fotocopia, grabación o cualquier otro, sin permiso previo por escrito de los titulares del copyright.

© Logroño, 2018

Instituto de Estudios Riojanos

C/ Portales, 2.

26001-Logroño, La Rioja (España)

© Diseño de cubierta e interior: ICE Comunicación

© Imagen de cubierta: Busto del Dr. Zubía delante del IES Práxedes Mateo Sagasta de Logroño. (Fotografía de Rafael Francia Verde)

© Imagen de contracubierta: Flora alóctona de las cavernas. Algas colonizando un espeleotema (gour) en la Gruta de la Paz en Ortigosa de Cameros. (Fotografía de Rubén Esteban Pérez)

ISSN 1131-5423

Depósito Legal LR 413-2012

Impreso en España - Printed in Spain

ÍNDICE

PRESENTACIÓN DEL MONOGRÁFICO

Patricia Pérez Matute (<i>Directora de Zubía</i>)	7
---	---

HOMENAJE A DON ILDEFONSO ZUBÍA

El catedrático logroñés Dr. Zubía <i>A. Ollero de la Torre</i> (1990)	13
--	----

AGRICULTURA

La concentración de nitratos y sales en flujos subsuperficiales de un área agrícola en el Valle del Iregua (La Rioja) <i>T. Lasanta Martínez, M. Maestro Martínez, y M. Paz Errea</i> (2007-2008)	35
--	----

BIOLOGÍA

Biodiversidad microscópica en el embalse de La Grajera (Logroño) <i>A. Guillén Oterino, e I. López de Munain Martínez</i> (2015-2016)	57
--	----

QUÍMICA, VITICULTURA Y ENOLOGÍA

Resonancia magnética nuclear en el vino. Seguimiento de las fermentaciones alcohólica y maloláctica en vinos de diferentes subzonas de la D.O. CA Rioja <i>E. López Rituerto, A. Avenzoza Aznar, J. H. Busto Sancirán, y J. Manuel Peregrina García</i> (2009)	143
Distribución territorial, caracterización paisajística y peligros y amenazas a los que está expuesta la única población de vid salvaje (<i>Vitis vinifera</i> L.) del Valle del Najerilla (La Rioja) <i>E. Prado Villar, y F. Martínez de Toda Fernández</i> (2009)	161
Los vinos tintos españoles de calidad, ¿a qué huelen según los expertos? <i>M^a. P. Sáenz-Navajas, M. González-Hernández, E. Campo, P. Fernández-urbano, y V. Ferreira</i> (2012)	187

FAUNA

Distribución de <i>Pipistrellus pipistrellus</i> (Schreber, 1774) y <i>Pipistrellus Pygmaeus</i> (Leacha, 1825) (Chiroptera: Vespertilionidae) en la Comunidad Autónoma de La Rioja <i>P. T. Agirre-Mendi, y C. Ibáñez</i> (2004)	215
Estudio faunístico y eco-epidemiológico de los mosquitos (Diptera, Culicidae) de La Rioja (Norte de España) <i>R. Bueno Marí</i> (2012)	227

FLORA

La filoxera en la provincia de Logroño. Destrucción del viñedo y su reconstitución <i>J. Provedo González</i> (1987)	253
Briófitos de ríos y bioindicación del cambio climático. Una experiencia en La Rioja <i>E. Núñez Olivera, J. Martínez Abaigar, R. Tomás, N. Beaucourt, y M. Arróniz</i> (2004)	319

GEOGRAFÍA

- Problemas de evolución geomorfológica en campos abandonados:
el valle del Jubera (Sistema Ibérico)
J. M. García Ruiz, T. Lasanta Martínez, e I. Sobrón García (1988) 345
-

GEOLOGÍA

- Geología del borde norte del Sistema Ibérico entre los ríos Iregua y Najerilla. La Rioja
F. Pérez-Lorente (1987) 365
-

- Actuaciones para la eliminación del tapiz algal presente en los espeleotemas
en la rehabilitación de las grutas visitables de La Paz y de La Viña en Ortigosa
de Cameros-La Rioja
R. Esteban Pérez (2014) 375
-

LAS MATEMÁTICAS Y SU HISTORIA EN ZUBÍA

- El problema de Dirichlet y la medida armónica
J. L. Rubio de Francia (1988) 405
- Sixto Cámara y los fundamentos del cálculo de probabilidades
J. J. Escribano Benito (2003) 429
-

MEDICINA Y FARMACOLOGÍA

- Tratamiento de aguas residuales de matadero. Comportamiento
de los microorganismos fecales
M. Cancer López (1994) 443
- Secuenciación masiva de DNA y aplicación práctica al diagnóstico
de la hipercolesterolemia familiar
M. Íñiguez Martínez, B. Ecurra García, Á. Brea-Hernando, y J. Cabello (2013) 461
-

PALEONTOLOGÍA

- Sauropod tracks and trackmakers: integrating the ichnological an skeletal records
J. O. Farlow (1992) 479
- Pistas terópodos en cifras
F. Pérez-Lorente (1996) 529
- Generalidades sobre las icnitas ornitópodos de La Rioja (Cuenca de Cameros. España)
I. Díaz-Martínez (2011) 549
-

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR EN EL VINO. SEGUIMIENTO DE LAS FERMENTACIONES ALCOHÓLICA Y MALOLÁCTICA EN VINOS DE DIFERENTES SUBZONAS DE LA D.O. CA. RIOJA

EVA LÓPEZ-RITUERTO¹

ALBERTO AVENOZA AZNAR¹

JESÚS HÉCTOR BUSTO SANCIRIÁN¹

JESÚS MANUEL PEREGRINA GARCÍA¹

RESUMEN

En los últimos años, el uso de la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) ha aumentado paulatinamente en la ciencia de los alimentos y más recientemente, el estudio metabonómico y/o metabolómico por RMN ha surgido como un campo de gran importancia. La espectroscopia de RMN tiene varias ventajas: la técnica no es destructiva, es rápida y no requiere apenas tratamiento previo de la muestra. Además, la RMN aporta detalles analíticos sobre una matriz biológica sin modificar. Con estas ventajas, el uso de la RMN en la investigación del vino surge como una herramienta esencial para aumentar la calidad de los vinos. En este artículo, se muestran las posibilidades de esta técnica para monitorizar la evolución de varios metabolitos en el vino de diversas zonas de producción de la Denominación de Origen Calificada Rioja.

Palabras clave: RMN, vino, metabonómica.

In the last years, nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy has been progressively used in food science and recently, NMR based metabonomic or/and metabolomic studies have appeared as fields of great importance. NMR spectroscopy has several advantages because the technique is non destructive, fast and requires, in most cases, a limited sample preparation. On the other hand, NMR technique provides detailed analytical profiles from the intact biological matrix. In this context, the use of NMR in wine research emerges as an essential tool in order to increase the quality of the wines. In

1. Departamento de Química, Universidad de La Rioja, Centro de Investigación en Síntesis Química, Grupo de Síntesis Química de La Rioja, UA-CSIC, 26006 Logroño. Telf.: +34 941 299630. eva.lopez@unirioja.es

this paper, we show the possibilities of this technique in order to monitoring several metabolites in wine from diverse areas of the Denominación de Origen Calificada Rioja.

Key words: NMR, wine, metabonomics.

INTRODUCCIÓN

La investigación en el mundo del vino está sufriendo en los últimos 10 años un espectacular auge, incrementándose al doble el número de artículos científicos referidos a este campo. Tanto en el terreno de la viticultura como en el de la enología los esfuerzos se encaminan a obtener un vino de calidad, para lo cual comprender los procesos involucrados en su producción se hace imprescindible.

El empleo de nuevas tecnologías y nuevo instrumental de contrastada solvencia en otras disciplinas científicas abre grandes posibilidades para el estudio de los procesos enológicos. En este punto, la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) está empezando a introducirse de forma gradual y con enorme éxito en la vitivinicultura (Pereira *et al.*, 2007). Durante años, la RMN ha sido utilizada para la determinación estructural de compuestos en disolución, destacando la elucidación estructural de multitud de proteínas, investigaciones que fueron premiadas con el Nobel de Química de 2002. Asimismo, se trata de la misma técnica que se emplea en Medicina en los análisis de Resonancia Magnética.

Más allá de utilizar esta herramienta para discriminar posibles adulteraciones, la RMN está siendo empleada en la determinación geográfica de variedades de uva y de las levaduras o bacterias usadas en la elaboración de vino (Son *et al.*, 2009). Dentro de estas nuevas aplicaciones, la metabolómica –descripción analítica de muestras biológicas complejas con el fin de caracterizar y cuantificar el número máximo de moléculas pequeñas (metabolitos)– debería constituir uno de los avances más rigurosos dentro del terreno de la vitivinicultura. La RMN permite, en un solo experimento, acceder a la información sobre multitud de compuestos.

La RMN es una técnica espectroscópica basada en las propiedades magnéticas de los núcleos. Tradicionalmente esta técnica ha sido utilizada en el mundo de la síntesis tanto orgánica como inorgánica para la elucidación de estructuras de compuestos en disolución. Pero con los avances informáticos y los imanes de alto campo alcanzados en los últimos años, la técnica ha ampliado su aplicación al análisis cuantitativo de los compuestos.

En numerosos trabajos esta técnica a nivel cuantitativo fue validada frente a otras de fiabilidad conocida como el HPLC. Pauli y sus colaboradores bautizaron a la técnica como qHNMR (*proton-specific quantitative NMR*) y mediante esta serie de trabajos demostraron el enorme potencial de esta técnica, no sólo en la identificación de compuestos sino también en la cuantificación de los mismos (Pauli *et al.*, 2005).

Con estos antecedentes y viendo sus posibilidades, era de esperar que se aplicara la técnica en el mundo de los alimentos y se comenzaran a registrar espectros de éstos (Cordella *et al.*, 2002) y de productos agrícolas (Dixon *et al.*, 2006). Así, enseguida aparecieron artículos que analizaban ácidos orgánicos y aminoácidos en cerveza (Almeida *et al.*, 2006), que cuantificaban el ácido clorogénico (Berregi *et al.*, 2003), la (-)-epicatequina (Berregi *et al.*, 2003), el ácido fórmico en sidra (Berregi *et al.*, 2007), el ácido málico y cítrico en zumos de fruta (Del Campo *et al.*, 2006) y los principales ácidos orgánicos en vinagres (Caligiani *et al.*, 2007). En los últimos años se han realizado interesantes trabajos en el mundo de la enología tanto en uvas (Gaudillere *et al.*, 2005) como en vino (Košir *et al.*, 2001).

Mediante los espectrómetros de RMN son muchos los núcleos que se pueden estudiar pero este trabajo se ha centrado en el estudio del protón, por el interés de realizar, no sólo un control cualitativo de las muestras de vino, sino también cuantitativo y por lo tanto emplear la técnica qHNMR.

En este contexto, nuestro grupo de investigación ha desarrollado y puesto a punto un método para la cuantificación de diversos metabolitos durante los procesos de fermentación alcohólica y maloláctica mediante RMN de protón (^1H RMN). Entre los puntos fuertes de esta metodología se encuentran la poca muestra necesaria para la realización del experimento y la escasa manipulación previa de la misma. Además se trata de un análisis no invasivo con el vino, no modificando su equilibrio biológico. De esta forma, se ha podido analizar la evolución de los ácidos málico y láctico a través de los procesos de fermentación alcohólica y maloláctica (Avenozza *et al.*, 2006).

Posteriormente se presentó la evolución de diversos metabolitos (etanol, ácido succínico, ácido acético, ácido málico y ácido láctico) en un estudio realizado sobre muestras de Bodegas Patrocinio S.C.L. Además, los experimentos de RMN, una vez adquiridos, pueden volver a analizarse en busca de nuevos metabolitos de interés, constituyendo al mismo tiempo una extraordinaria “biblioteca de metabolitos” a la que acudir para estudiar diferentes evoluciones a lo largo de los años (López-Rituerto *et al.*, 2009). En el presente trabajo, se ha extendido esta metodología a diferentes zonas de la Denominación de Origen Calificada Rioja incluyendo Rioja Baja, Rioja Alta y Rioja Alavesa.

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1. Instrumentación

El equipo empleado fue un espectrómetro Bruker Avance 400 (Figura 1a), equipado con una sonda BBI H-BB Z-GRD, específica para una adecuada adquisición de protón. La adquisición del espectro fue llevada a cabo con el programa XWIN-NMR (versión 3.5). El procesado de los espectros se llevó a cabo mediante el programa MestRe-C (versión 4.1.7 y 4.9.9) y MestReNova (versión 5.0). Para la obtención de los espectros se ajustó el campo para la mezcla $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ y se realizaron todos los experimentos a 25 °C.

Como paso previo, es necesario calibrar el pulso de excitación P1, cuyo valor oscilaba en los experimentos descritos en la presente memoria entre 6,0 y 7,1 μ s empleando una potencia de -1 dB (Wells *et al.* 2004). A continuación, el proceso de adquisición es repetido un número de veces (scan) con el fin de sumar la respuesta que nos ofrece la muestra e incrementar la relación señal/ruido y por tanto la sensibilidad (Figura 1b).

Esta respuesta o FID (*Free Induction Decay*), se convierte en un espectro de señales en función de su frecuencia, utilizando una operación matemática llamada Transformada de Fourier (FT) (Figura 1b).

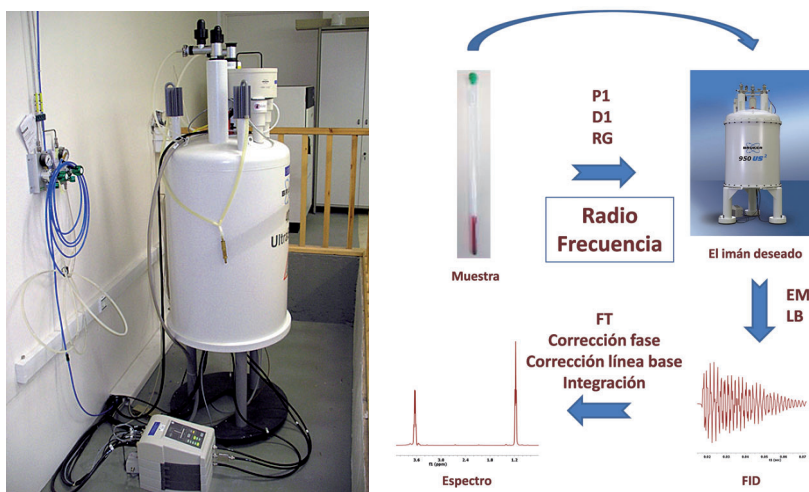


Fig. 1. a) Equipo de RMN empleado. b) Esquema de adquisición y procesado del espectro.

Los espectros de RMN de ^1H fueron registrados con una secuencia de pulsos de presaturación de la señal de agua situada a 1875 Hz usando el programa de pulsos zgpr con un valor del pulso p19 situado en 60 dB y un ángulo de 90° . La anchura espectral fue de 10 ppm adquiriendo los datos con 4 scans previos (dummy scans) y 128 scans de adquisición conformando un tamaño de FID de 64 K. La muestra se preparó en todos los casos con una proporción 9:1 de $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ de la forma que se explica más adelante y se introdujo en un tubo de RMN de 5 mm de diámetro.

La FID fue exportada al programa MestRe-C, programa sobre el que se realizó el procesado. En primer lugar se realizó la transformada de Fourier ajustándola con una multiplicación exponencial de 0,01Hz, para obtener una relación señal/ruido óptima. De acuerdo con la bibliografía, la fase del espectro se ajustó manualmente utilizando el submenú “Phase Correction” mientras que la línea de base se ajustó mediante la función “Multipoint Baseline Correction” (Pauli *et al.*, 2001). Hay que destacar que a partir de un

solo espectro, y por tanto un solo experimento, se puede acceder a la cuantificación simultánea de todos estos compuestos.

El método empleado para eliminar la señal de agua fue la supresión de la señal mediante el programa específico que se ha comentado anteriormente, simplificando así los tratamientos previos sobre cada muestra, reduciéndose a dos:

1. ajuste del pH a 3 con una disolución de HCl 1M,
2. adición de agua deuterada (D₂O), tomando 450 µL de mosto/vino y 50 µL de D₂O.

Para calibrar el desplazamiento químico, la sal sódica del ácido 2,2,3,3-d4-(trimetilsilil)propanoico (TSP) se disuelve en el D₂O. Cada muestra se introduce en un tubo de RMN de 5 mm de diámetro.

El método de cuantificación empleado fue el estándar externo validado en estudios previos, (Avenozza *et al.*, 2006); (López-Rituerto *et al.*, 2009), utilizando el ácido succínico como patrón externo. Usando el mismo procedimiento comentado anteriormente se obtuvo una constante que relacionaba el área de cada compuesto con la señal de ácido succínico (Tabla 1), mediante la siguiente ecuación:

$$k = A_{PE}/A_A \times C_A/C_{PE} \times N_A/N_{PE}$$

donde A_{PE} es la integral absoluta del patrón externo (ácido succínico), A_A es la integral absoluta del analito a determinar, C_A es la concentración del analito, C_{PE} es la concentración del patrón externo, N_A es el número de protones para la señal del analito y N_{PE} es el número de protones para el patrón externo (ácido succínico 4H). Se realizaron 3 experimentos con el fin de evaluar la reproducibilidad de las constantes calculadas, de manera que los valores y desviaciones estándar obtenidos para cada compuesto fueron los siguientes:

TABLA 1.

TABLA RESUMEN DE LAS CONSTANTES QUE RELACIONAN CADA COMPUESTO CON EL ÁCIDO SUCCÍNICO

	Etanol	Etanol satélite	Ácido acético	Ácido málico	Ácido láctico	Ácido succínico	Prolina	Alanina
k1	0,911	1,05	0,934	0,978	0,969	0,952	0,966	1,07
σ	0,019	0,10	0,091	0,028	0,033	0,051	0,018	0,13

1.2. Muestras

Las muestras estudiadas en el trabajo de puesta a punto de la técnica fueron mostos y vinos de Bodegas Patrocinio S.C.L., perteneciente a la Denominación de Origen Calificada Rioja, de la vendimia del 2006. La uva, de variedad Tempranillo, fue vendimiada en el momento óptimo de madu-

ración (223 g/L de glucosa+fructosa; 4,17 g/L de acidez total expresada en H_2SO_4 ; pH de 3,47) y vinificada de modo tradicional, con un despalillado total y un estrujado parcial y encubada en depósitos de acero inoxidable de 500 HL. La uva fue tratada con SO_2 gas y se inoculó con levaduras secas activas para inducir la fermentación alcohólica.

Finalizada la fermentación alcohólica, el depósito se descubrió y se mezcló con otro de características similares (230 g/L de glucosa-fructosa, 4,21 g/L de acidez total expresada en H_2SO_4 , pH de 3,56). A partir de que comenzara el proceso de fermentación, se tomaron 25 mL de mosto/vino en diferentes momentos del proceso de vinificación y fueron congeladas hasta el momento de realizar el análisis.

Por otro lado, se decidió abordar un estudio en profundidad que recogiera zonas representativas de la Denominación de Origen Calificada Rioja (D.O.Ca. Rioja). El reglamento reconoce la existencia de tres subzonas con características vitivinícolas diferenciadas: Rioja Alavesa, influenciada por el clima atlántico; Rioja Alta también por el clima atlántico y Rioja Baja que posee un clima más seco y cálido debido a la influencia mediterránea. Se recogieron muestras de las tres subzonas correspondientes a bodegas localizadas en Haro, Navarrete, San Asensio, Arenzana de Abajo, Arnedo, Aldeanueva de Ebro, Alcanadre y Labastida tal y como se indica en la Figura 2.



Fig. 2. Zonas muestreadas en la D.O.Ca. Rioja.

Basándose en las diferencias marcadas por la denominación de origen, este estudio se ha centrado en seguir la evolución de vinos de las diferentes subzonas mediante la técnica de RMN de 1H cuantitativa, puesta a punto por nuestro grupo de investigación y comentado anteriormente.

Los compuestos estudiados en todas las subzonas fueron: etanol, ácido acético, ácido succínico, ácido málico y ácido láctico (Figura 3). En la Figura 4, se puede ver un espectro de RMN de protón de una muestra de vino en la que se remarcan las señales correspondientes a los compuestos a estudiar. Para desarrollar la qHNMR es esencial la selección apropiada de los parámetros de procesamiento de los espectros, además de optimizar la integración de los señales. La zona del espectro en la cual se procedió a la corrección de la línea de base de un modo más exhaustivo durante el procesamiento fue el intervalo de 0,8 a 3,2 ppm (Figura 4).

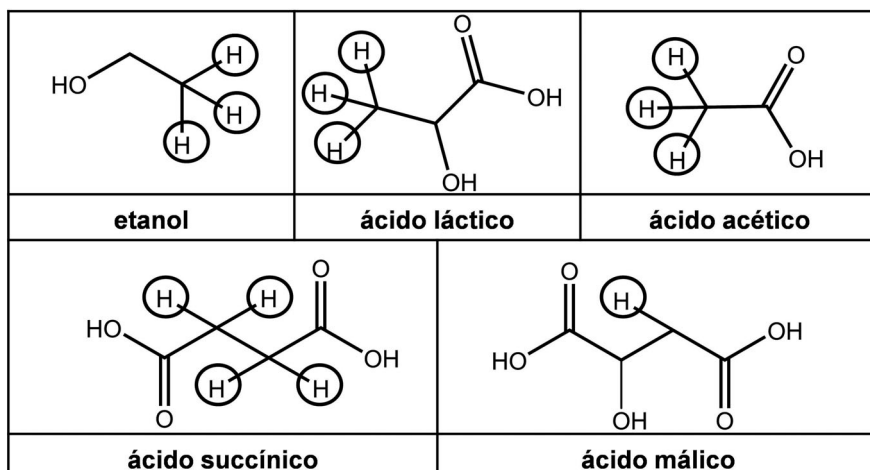


Fig. 3. Estructuras de los compuestos a analizar, identificando en cada uno de ellos los protones integrados en un espectro de RMN de ^1H (400 MHz).

Las señales empleadas en la cuantificación fueron: para el etanol, un grupo metilo (tripleto, $^3J=7,2$ Hz, 3H a 1,18 ppm); para el ácido láctico un grupo metilo (doblete, $^3J=6,9$ Hz, 3H a 1,40 ppm); para el ácido acético un grupo metilo (singleto, 3H a 2,06 ppm); para el ácido succínico dos grupos metilenos (singleto, 4H a 2,65 ppm) y para el ácido málico un protón diastereotópico (doblete de dobletes $^3J=8,0$ Hz, $^2J=16,4$ Hz, 1H a 2,83 ppm).

Para realizar los experimentos, en cada bodega se recogieron 20 mL de mosto/vino en diferentes momentos de la elaboración del vino:

1. antes de comenzar la fermentación alcohólica
2. al final de la fermentación alcohólica
3. al comienzo de la fermentación maloláctica
4. a mitad de la fermentación maloláctica
5. al final de la fermentación maloláctica.

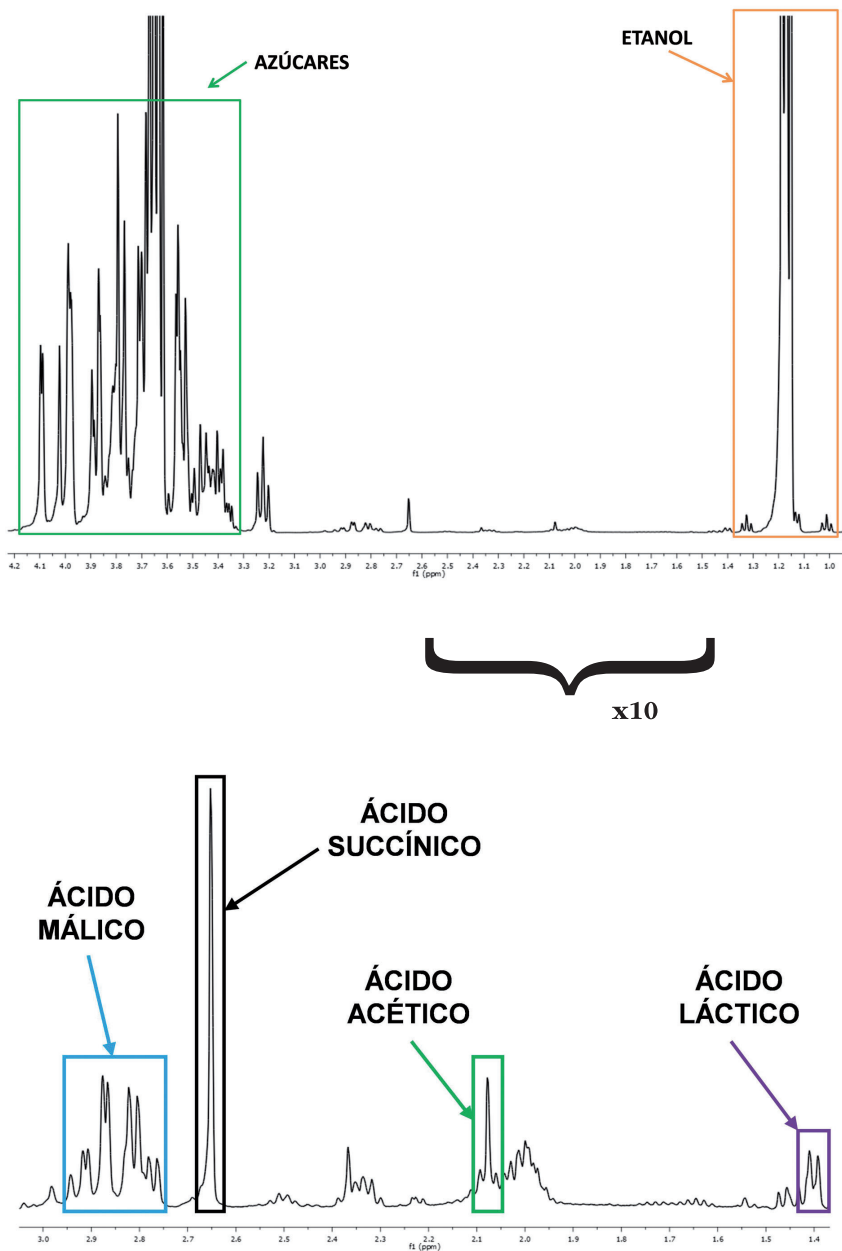


Fig. 4. Espectro de RMN de protón (400 MHz) de mosto/vino a pH=3, desatando las señales correspondientes a los compuestos del vino analizados.

2. RESULTADOS

2.1. Bodegas Patrocinio SCL. Uruñuela

2.1.1. EVOLUCIÓN DEL GRADO ALCOHÓLICO (v/v)

El componente más abundante del vino después del agua es el etanol por eso, a la hora de estudiar la evolución de la fermentación alcohólica, el punto de partida de este trabajo fue el seguimiento de etanol. Las muestras se analizaron mediante diferentes métodos con el fin de contrastar los resultados.

Los análisis empleados fueron la técnica de RMN de protón y la técnica de infrarrojo (Foss WineScan™ FT 120) empleada por la bodega. En algunos vinos se puso en práctica un nuevo método de RMN específico para la determinación del grado alcohólico, denominado método directo en la figura 5. Este método permite calcular el grado de un vino en apenas 5 minutos (tiempo de adquisición y de análisis), un tiempo bastante bajo si lo comparamos no sólo con técnicas más modernas, sino también con métodos oficiales de la OIV o métodos oficiosos utilizados más habitualmente en las bodegas. Este método, quizás por su rapidez, puede considerarse en la actualidad como la técnica más rápida y efectiva de obtener el grado de un vino.

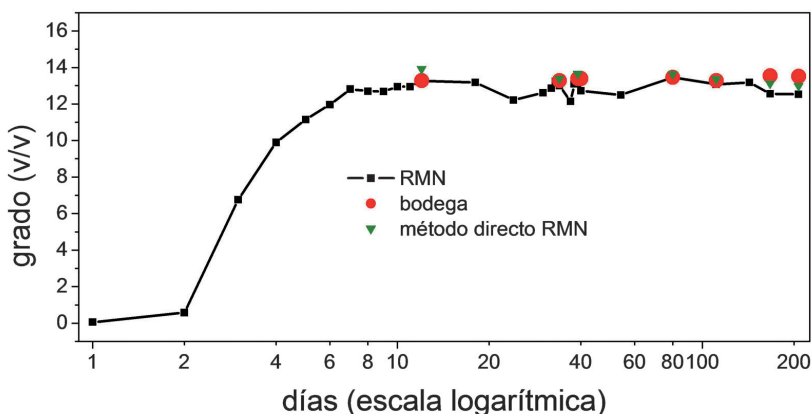


Fig. 5. Evolución del etanol, expresado en grado alcohólico (% v/v), medido mediante resonancia magnética nuclear y técnicas de infrarrojo realizadas por la bodega (Foss WineScan™ FT 120).

Para todos los casos, los resultados obtenidos por las diferentes técnicas fueron bastantes similares, describiendo una cinética típica de la fermentación alcohólica.

2.1.2. EVOLUCIÓN DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS

El ácido succínico se forma al inicio de la fermentación alcohólica durante la respiración de las levaduras en el ciclo de Krebs (Ribéreau-Gayon

et al., 2006), por esta razón habitualmente es usado como marcador de la cinética de la fermentación alcohólica. Desde el comienzo de la fermentación empieza a aumentar su contenido en el vino, alcanzando el valor máximo al finalizar la fermentación alcohólica, llegando a valores próximos a 1 g/L.

El contenido de ácido succínico en un vino está relacionado con el contenido de etanol a través de la actividad de las levaduras. Después, durante la fermentación maloláctica y durante la conservación del vino, la concentración se mantiene más o menos constante (Figura 6).

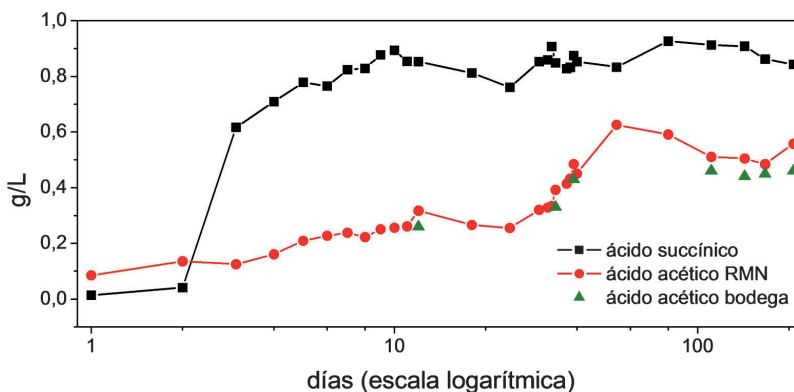


Fig. 6. Evolución de los ácidos succínico y acético medidos mediante RMN y del ácido acético medido por la bodega mediante técnicas de infrarrojo (Foss WineScan™ FT 120).

Uno de los ácidos orgánicos más estudiados debido a su repercusión en la calidad de los vinos es el ácido acético, compuesto mayoritario de la denominada acidez volátil. Este ácido se forma a partir de la reacción de oxidación del acetaldehído, también a partir del metabolismo de las pentosas durante la fermentación maloláctica y por último a través de las bacterias acéticas en ambientes aerobios.

El contenido de ácido acético fue medido mediante varios métodos, con el fin de contrastar los resultados. Los métodos empleados fueron el RMN de protón y la técnica de infrarrojo (Foss WineScan™ FT 120) empleada por la bodega (Figura 6).

Los resultados obtenidos mediante las dos técnicas fueron bastante similares mostrando un aumento gradual del contenido de ácido acético durante las fermentaciones alcohólica y maloláctica. Fue durante su conservación, a partir del día 35, cuando aumentó la formación del ácido acético probablemente por la acción de las bacterias acéticas (Figura 6).

Junto con la formación del etanol, el seguimiento de la degradación del ácido málico a ácido láctico durante la fermentación maloláctica es un punto fundamental para el control de la calidad de un vino. La suavidad alcanzada en los vinos tintos una vez realizado dicho proceso aporta carac-

terísticas importantes al vino, además de alcanzar una estabilidad microbiana importante para un vino enfocado a crianza.

Los valores iniciales del ácido málico dependen de las condiciones climáticas durante la maduración de la uva, años fríos conceden a las uvas un alto contenido de ácido málico. En general, en la D.O. Ca. Rioja los valores de ácido málico oscilan entre 2 y 3 g/L. En este caso, el valor inicial de ácido málico fue de 2,28 g/L.

Mediante el seguimiento de la fermentación maloláctica se observó la conversión del ácido málico en ácido láctico (Figura 7), alcanzando alrededor del día 35 el valor máximo del ácido láctico y prácticamente eliminando el ácido málico.

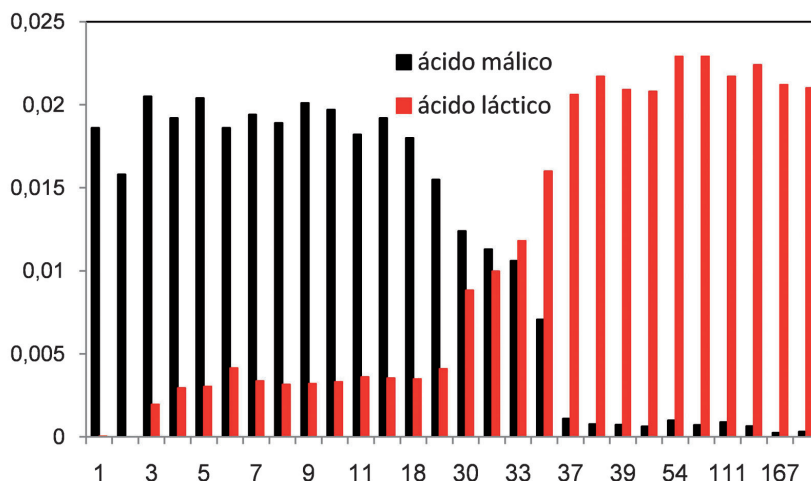


Fig. 7. Evolución de los ácidos málico y láctico medidos mediante RMN, cuantificados por patrón externo y expresados en mol/L.

2.2. Estudio de las diferentes subzonas

2.2.1. RIOJA ALTA

Se muestrearon cuatro bodegas de la subzona de la Rioja Alta, situadas en las localidades de Haro, Navarrete, San Asensio y Arenzana de Abajo.

Para llevar a cabo el seguimiento de la fermentación alcohólica se cuantificó la cantidad de etanol generado por las levaduras a partir del mosto inicial. Para ello, se empleó el método del patrón externo explicado con anterioridad. Los resultados se pueden observar en la siguiente gráfica (Figura 8), en términos de grado alcohólico expresados en % v/v. Para todos los casos se obtuvieron vinos comprendidos entre los 12,5 y 14 grados, niveles que son habituales en los vinos actuales de la Rioja Alta.

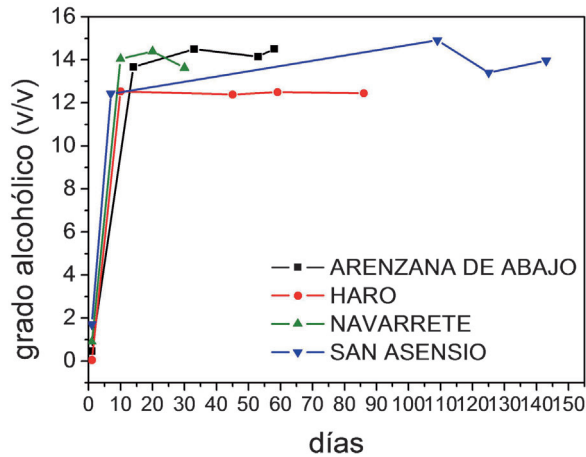


Fig. 8. Evolución del contenido en etanol en vinos de cuatro bodegas de Rioja Alta.

Del mismo modo, se siguió la evolución de la fermentación maloláctica. Como se puede observar en la Tabla 2, los valores de ácido málico variaron entre 2 y 2,8 g/L, valores habituales en la D.O.Ca. Rioja. En todas las bodegas se observó una conversión del ácido málico al ácido láctico no quedando en ninguna de ellas apenas ácido málico residual.

En cuanto a la evolución del ácido acético durante la vinificación en todas las bodegas, se obtuvieron valores que no llegaban al umbral de detección organoléptica, y siempre por debajo 1 g/L, valor a partir del cual podría verse afectada la calidad del vino. En la Tabla 2 se pueden observar los valores alcanzados por cada una de las bodegas, obteniendo en todas ellas valores inferiores a 0,6 g/L.

2.2.2. RIOJA BAJA

Se controló a las tres bodegas de la subzona de Rioja Baja, situadas en las localidades de Arnedo, Aldeanueva de Ebro y Alcanadre. Se hizo el seguimiento para todas las bodegas de las fermentaciones alcohólica y maloláctica empleando la metodología anteriormente explicada.

La fermentación alcohólica en todas las bodegas siguió una cinética de fermentación adecuada, alcanzándose valores comprendidos entre 13 y 14 grados (Figura 9).

El nivel de ácido málico para la bodega de Arnedo y Alcanadre fue próximo a 1,50 g/L, mientras que en la bodega de Aldeanueva de Ebro, la cantidad de ácido málico fue de 1,98 g/L. Como antes se ha mencionado, las condiciones climáticas influyen en el contenido inicial del ácido málico en las uvas, por eso la Rioja Baja se caracteriza por tener un nivel de ácido málico inferior al del resto de la D.O.Ca. Rioja al poseer mayores temperaturas medias durante el período de maduración (Tabla 3).

TABLA 2.
EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO EN ÁCIDOS ACÉTICO, MÁLICO Y LÁCTICO DURANTE LA ELABORACIÓN DEL VINO EN CUATRO BODEGAS DE RIOJA ALTA

Momento de la recogida de la muestra	Rioja Alta											
	Haro			Arenzana de abajo			Navarrete			San Ascensio		
	Ácido Acético (g/L)	Ácido Málico (g/L)	Ácido Láctico (g/L)	Ácido Acético (g/L)	Ácido Málico (g/L)	Ácido Láctico (g/L)	Ácido Acético (g/L)	Ácido Málico (g/L)	Ácido Láctico (g/L)	Ácido Acético (g/L)	Ácido Málico (g/L)	Ácido Láctico (g/L)
Inicio FA	0,0550	2,06	0,0141	0,076	2,69	0,000	0,232	2,77	0,000	0,248	1,80	0,000
Final FA	0,257	1,69	0,733	0,355	2,32	0,264	0,291	2,46	0,317	0,354	1,89	0,233
Inicio FML	0,303	1,61	0,789	0,357	2,28	0,245	0,408	0,383	1,77	0,424	2,00	0,336
Mitad FML	0,443	0,110	2,07	0,391	0,319	1,58	0,548	0,124	2,14	0,414	0,933	0,965
Final FML	0,535	0,255	1,97	0,361	0,0952	1,53	0,533	0,151	2,05	0,425	0,140	1,56

TABLA 3.
EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO EN ÁCIDOS ACÉTICO, MÁLICO Y LÁCTICO DURANTE LA ELABORACIÓN DEL VINO EN TRES BODEGAS DE RIOJA BAJA Y UNA DE RIOJA ALAVESA

Momento de la recogida de la muestra	Rioja Baja											
	Arnedo			Aldeanueva de Ebro			Alcanadre			Rioja Alavesa		
	Ácido Acético (g/L)	Ácido Málico (g/L)	Ácido Láctico (g/L)	Ácido Acético (g/L)	Ácido Málico (g/L)	Ácido Láctico (g/L)	Ácido Acético (g/L)	Ácido Málico (g/L)	Ácido Láctico (g/L)	Ácido Acético (g/L)	Ácido Málico (g/L)	Ácido Láctico (g/L)
Inicio FA	0,0806	1,49	0,000	0,081	1,58	0,0394	0,104	1,96	0,00286	0,130	2,47	0,271
Final FA	0,336	1,96	0,282	0,246	1,36	0,236	0,228	2,14	0,343	0,293	2,10	0,260
Inicio FML	0,425	1,94	0,265	0,403	1,68	0,274	0,280	1,85	0,508	0,269	3,41	0,261
Mitad FML	0,640	0,0792	1,80	0,386	1,48	0,321	0,353	0,203	1,68	0,353	0,842	1,25
Final FML	0,701	0,0893	1,80	0,453	0,713	0,938	0,455	0,105	1,96	0,477	0,408	1,66

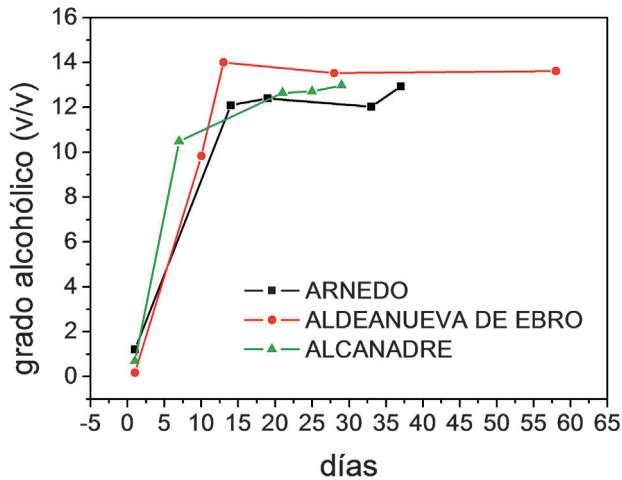


Fig. 9. Evolución del contenido en etanol en vinos de tres bodegas de Rioja Baja.

Nuevamente, se observó en todos los casos una conversión del ácido málico al ácido láctico, salvo en el caso de la bodega de Aldeanueva de Ebro que la conversión fue parcial, quedando algo de ácido málico residual en el vino.

También se hizo un seguimiento de su evolución a lo largo de las dos fermentaciones, tanto la alcohólica como la maloláctica. En todas las bodegas de la Rioja Baja estudiadas se obtuvieron valores adecuados para un vino de calidad. En la Tabla 3 se pueden observar los valores alcanzados por cada una de las bodegas.

2.2.3. RIOJA ALAVESA

Se escogió una sola bodega situada en la localidad de Labastida (Álava) y se empleó la misma metodología de estudio. Al igual que en el resto de la subzonas anteriores la fermentación alcohólica también describió una cinética adecuada alcanzando un grado de 13,7 % v/v.

La fermentación maloláctica en esta bodega duró considerablemente más que en el resto de las bodegas estudiadas. La concentración inicial de ácido málico fue de 2,47 g/L, y su conversión en ácido láctico duró 100 días. Uno de los motivos principales de la lentitud de la fermentación fue que la primavera en ese año fue bastante fría. La conversión no fue total y en el vino quedaron 0,41 g/L de ácido málico residual (Tabla 3).

En esta subzona, al igual que en las anteriores, la acidez volátil no fue elevada obteniéndose una concentración de ácido acético después de la fermentación maloláctica de 0,48 g/L, valor inferior a los aconsejables para la obtención de un vino de calidad.

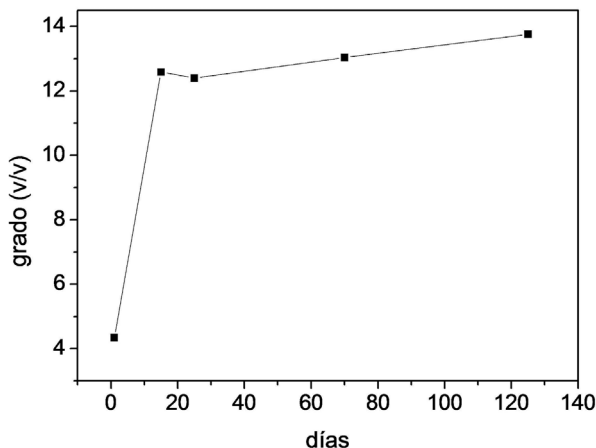


Fig. 10. Evolución del contenido en etanol en vinos de Rioja Alavesa (Labastida).

3. CONCLUSIONES

Con este trabajo se ha demostrado el enorme potencial de la técnica de RMN de protón como herramienta para el seguimiento de procesos biológicos como las fermentaciones alcohólica y maloláctica. La RMN como herramienta para el análisis de metabolitos abre un mundo de posibilidades para el conocimiento y control de un proceso tan complejo como es la transformación de mosto en vino. También se presenta una nueva manera de medir el grado alcohólico de un vino en un menor tiempo que los métodos convencionales. En el futuro se quiere automatizar el proceso, para obtener una mayor información cuantitativa, y realizar análisis de datos asistidos mediante diversas herramientas quimiométricas.

AGRADECIMIENTOS

Nos gustaría agradecer a Miguel Ángel Ciria (Presidente de Bodegas Patrocinio S.C.L.) y a Víctor Pascual (Presidente del Consejo Regulador de la D.O.Ca. Rioja) por el apoyo mostrado. También agradecemos a Bodegas Patrocinio S.C.L. y al resto de las bodegas colaboradoras por las muestras aportadas. Eva López Rituerto agradece a la Universidad de la Rioja por la beca predoctoral y al I.E.R. (Instituto de Estudios Riojanos) por la ayuda económica.

BIBLIOGRAFÍA

Almeida, C., Duarte, I.F., Barros, A., Rodrigues, J., Spraul, M., Gil, A.M. 2006. Composition of beer by ^1H NMR spectroscopy: Effects of brewing site and date of production. *J. Agric. Food Chem.* (54) 700-706.

- Avenzoza, A., Busto, J.H., Canal, N., Peregrina, J.M. 2006. Time course of the evolution of malic and lactic acids in the alcoholic and malolactic fermentation of grape must by quantitative ^1H NMR (qHNMR) spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* (54) 4715-4720.
- Berregi, I., del Campo, G., Caracena, R., Miranda, J.I. 2007. Quantitative determination of formic acid in apple juices by ^1H NMR spectrometry. *Talanta* (72) 1049-1053.
- Berregi, I., Santos, J.I., del Campo, G., Miranda, J.I. 2003. Quantitative determination of (-)-epicatechin in cider apple juices by ^1H NMR. *Talanta* (61) 139-145.
- Berregi, I., Santos, J.I., del Campo, G., Miranda, J.I., Aizpurua, J.M. 2003. Quantitation determination of chlorogenic acid in cider apple juices by ^1H NMR spectrometry. *Anal. Chim. Acta* (486) 269-274.
- Caligiani, A., Acquotti, D., Palla, G., Bocchi, V. 2007. Identification and quantification of the main organic components of vinegars by high resolution ^1H NMR spectroscopy. *Anal. Chim. Acta* (585) 110-119.
- Cordella, C., Moussa, I., Martel, A.C., Sbirrazzuoli, N., Lizzani-Cuvelier, L. 2002. Recent developments in food characterization and adulteration detection: Technique-oriented perspectives. *J. Agric. Food Chem.* (50) 1751-1764.
- Del Campo, G., Berregi, I., Caracena, R., Santos, J.I. 2006. Quantitative analysis of malic and citric acids in fruit juices using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Anal. Chim. Acta* (556) 462-468.
- Dixon, R.A., Gang, D.R., Charlton, A.J., Fiehn, O., Kuiper, H.A., Reynolds, T.L., Tjeerdema, R.S., Jeffery, E.H., German, J.B., Ridley, W.P., Seiber, J.N. 2006. Perspective - Applications of metabolomics in agriculture. *J. Agric. Food Chem.* (54) 8984-8994.
- Košir, I.J., Kidrič, J., 2001. Identification of amino acids in wines by one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* (49) 50-56.
- López-Rituerto, E., Cabredo, S., López, M., Avenzoza, A., Busto, J.H., Peregrina, J.M. 2009. A thorough study on the use of quantitative ^1H NMR in the Rioja red wine fermentation processes. *J. Agric. Food Chem.* (57) 2112-2118.
- Pauli, G.F. 2001. qNMR –A versatile concept for the validation of natural product reference compounds. *Phytochem. Anal.* (12) 28-42.
- Pauli, G.F., Jaki, B.U., Lankin, D.C. 2005. Quantitative ^1H NMR: development and potential of a method for natural products analysis. *J. Nat. Prod.* (68) 133-149.
- Pereira, G.E., Gaudillere, J.-P., Van Leeuwen, C., Hilbert, G., Maucourt, M., Deborde C., Moing, A., Rolin, D. 2007. ^1H -NMR metabolic profiling of wines from three cultivars, three soil types and two contrasting vintages. *J. Inter. Sci. Vigne Vin* (41) 103-110.

- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A. 2006. Handbook of Enology Volume 1. The microbiology of wine and vinifications 2^a Edition, *John Wiley and Sons*, Ltd.
- Son, H.-S., Hwang, G.-S., Kim, K.M., Ahn, H.-J., Park, W.-M., Van Den Berg, F., Hong, Y.-S. Lee, C.-H. 2009. Metabolomic studies on geographical grapes and their wines using ¹H NMR analysis coupled with multivariate statistics. *J. Agric. Food Chem.* (57) 1481-1490.
- Wells, R.J., Cheung, J., Hook, J.M. 2004. Dimethylsulfone as a universal standard for analysis of organics by QNMR. *Accred. Qual. Assur.* (9) 450-456.



ZUBÍA

30



Gobierno de La Rioja
www.larioja.org

 **Instituto
de Estudios
Riojanos**