



SEGUIMIENTO EN CONTINUO DE MICROFERMENTACIONES ALCOHÓLICAS MEDIANTE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PROTÓN

Eva López-Rituerto, Iván Antón, Alberto Avenoz, Jesús H. Busto,* Jesús M. Peregrina.*

Departamento de Química, Universidad de La Rioja, Grupo de Síntesis Química de La Rioja, UA-CSIC, 26006 Logroño. Fax: +34 941 299655.
hector.busto@unirioja.es, jesusmanuel.peregrina@unirioja.es

Resumen:

Recientemente nuestro grupo de investigación ha puesto a punto un protocolo de RMN de protón para la cuantificación de los ácidos málico y láctico en procesos de fermentación alcohólica y maloláctica sin necesidad de preparación previa de la muestra (qHNMR). Nuestro objetivo ahora es la monitorización en continuo de estos procesos mediante RMN de protón. Con este objetivo se han realizado microfermentaciones en tubos de RMN, empleando para ello cantidades inferiores al mililitro, con el fin de evaluar la acción de las levaduras sembradas. Esta monitorización en continuo permite la toma de datos cada dos horas y la realización del seguimiento de diversos compuestos en un solo experimento.

Palabras clave: Resonancia Magnética Nuclear, cuantificación, fermentación alcohólica.

1. INTRODUCCIÓN

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una técnica espectroscópica basada en las propiedades magnéticas de los núcleos y desde 1943 ha estado ligada a los premios Nobel, tanto de Física, como de Química y Medicina. La RMN y en concreto la RMN de protón (^1H RMN) permite la detección simultánea de una gran cantidad de componentes orgánicos o metabolitos presentes en una muestra. La única condición para su presencia en el espectro es la existencia en la molécula de protones, algo que la gran mayoría de los productos de interés poseen [1].

Dentro del campo de la Química la RMN ha sido empleada como una potente herramienta estructural para la caracterización de nuevos compuestos y para el estudio de las diferentes conformaciones que pueden adoptar las biomoléculas en disolución. Sin embargo, en los últimos años la técnica está siendo explorada en campos como el de la Ciencia de los Alimentos o en Ciencias de la Salud. Dentro del estudio de los alimentos, la RMN presenta una forma directa de cuantificar diversos compuestos de una mezcla compleja en un solo experimento. A esta reciente aplicación se le denomina como qHNMR [2] (de sus siglas en inglés *quantitative hydrogen nuclear magnetic resonance*) y está siendo la base, junto con la espectrometría de masas, de la moderna rama de la ciencia bautizada como metabonómica. Dentro del terreno de las bebidas, y en concreto en la enología está siendo considerable el aumento de publicaciones que relacionan ambos aspectos, vino y RMN.

De esta forma, se han desarrollado en los últimos años perfiles metabólicos sobre frutas, zumos de frutas, aceite de oliva, café, sidra y también por supuesto sobre mosto y vino. De todos estos trabajos cabe destacar dos por su extremada calidad. Uno desarrollado por el profesor Jens Duus, de los laboratorios Carlsberg de Dinamarca, en el que se aborda la cuantificación de aminoácidos y ácidos orgánicos en la cerveza. Por otro lado, en un reciente estudio, el famoso enólogo francés **Jean-Pierre Gaudillere** (Director de

Investigación del Instituto Nacional de Investigación Agrícola, INRA de Burdeos) en colaboración con científicos expertos en RMN han desarrollado esta metodología sobre vinos de Burdeos [3].

En nuestro grupo de investigación estamos desarrollado un proyecto en el que se ha puesto a punto la metodología para la obtención de información cuantitativa mediante ^1H RMN de muestras procedentes de diferentes bodegas [4]. Para la comprobación del buen funcionamiento del método decidimos, en un primer lugar, realizar la cuantificación de algún compuesto de fácil medición por otra técnica. Escogimos, por su importancia en la elaboración del vino, el seguimiento de los ácidos málico y láctico. De esta forma hemos analizado la evolución de diversos vinos desde su entrada en bodega hasta la finalización de la fermentación alcohólica y posteriormente la fermentación maloláctica (Fig. 1).

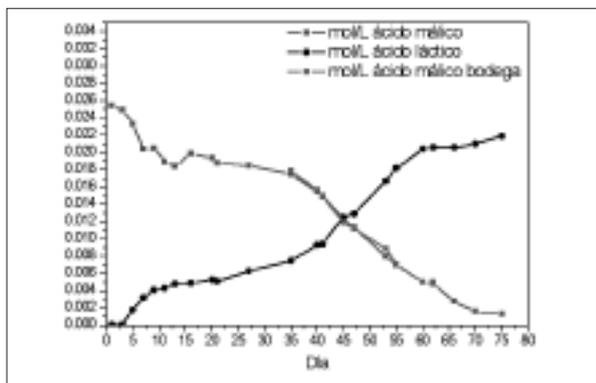
Con los buenos resultados obtenidos decidimos abordar la cuantificación de diversos componentes en fermentaciones realizadas en el propio tubo de RMN. Abordamos en este trabajo un primer estudio exploratorio realizando una microfermentación alcohólica a temperatura controlada y con toma de datos de forma continua.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

La uva procede de la finca Vista Hermosa del término municipal de Tudelilla y corresponde a una variedad garnacha de 20 años. El mosto fue obtenido tras un despallado total con doce horas de maceración y un posterior sangrado. Una vez decantado el mosto fue inoculado con levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, Uvaferm BC[®], 40 mg en 60 mL) y se cogieron 0.45 mL de mosto a los que se les añadió 0.05 mL de D₂O (relación H₂O/D₂O 9:1). La muestra fue introducida en un tubo de RMN cerrándolo con un tapón perforado con la finalidad de permitir la salida de CO₂.

Los experimentos fueron realizados en un espectrómetro Bruker Avance equipado con una sonda de detección inversa de 5-mm con gradientes en Z (BBI H-BB Z-GRD)

Fig. 1. Evolución de los ácidos málico y láctico medidos por ¹H RMN y su comparación con los datos obtenidos mediante medidas enzimáticas



y con unidad de temperatura variable. La adquisición de los espectros fue realizada con el programa TOPSPIN (versión 1.3) y el procesado de los mismos se realizó con el programa MestRe-C (versión 4.9.9.9)

Los espectros de ¹H RMN se realizaron directamente sobre la muestra de vino con la preparación comentada anteriormente utilizando un programa de pulsos de presaturación de agua (zgpr, p19 a 60 dB y un ángulo de 90°) a la temperatura constante de 299 K. Se realizaron 30 experimentos de forma continua con una duración de cada experimento de 2 h y 30 min empleando el programa auxiliar de Bruker multizg. La anchura espectral fue fijada en 10 ppm y los datos recogidos en 64 K después de 128 scans más 4 scans previos. El retardo entre pulsos (d1) fue de 60 segundos con el fin de entrar en el intervalo de 5xT1 para todos los protones tal y como sugiere la literatura específica. El pulso de 90 fue convenientemente calibrado en 6.9 μs con un nivel de potencia de -1 dB. Los experimentos fueron llevados a cabo con las herramientas ATM (tuning y matching automático) y GRADSHIM.

3. RESULTADOS

Conforme se realizaron los experimentos se fueron monitorizando para comprobar la evolución de la fermenta-

Fig. 2. Seguimiento de la fermentación alcohólica en un tubo de RMN

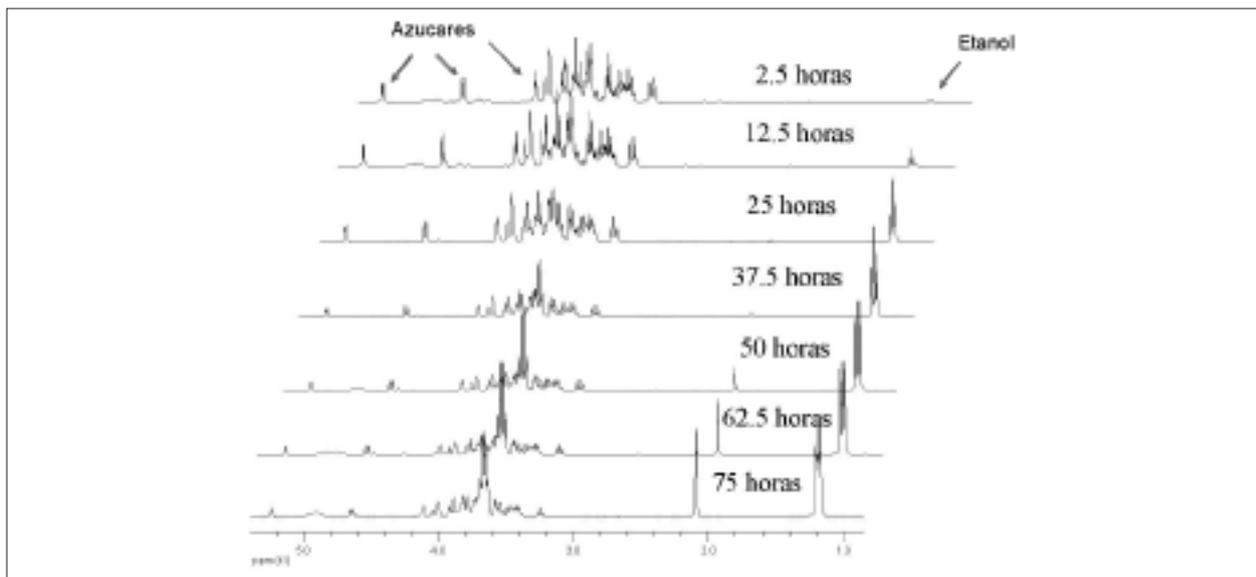


Fig. 3. Evolución de etanol, ácido acético (gráfica A) y de los ácidos málico y láctico (gráfica B)

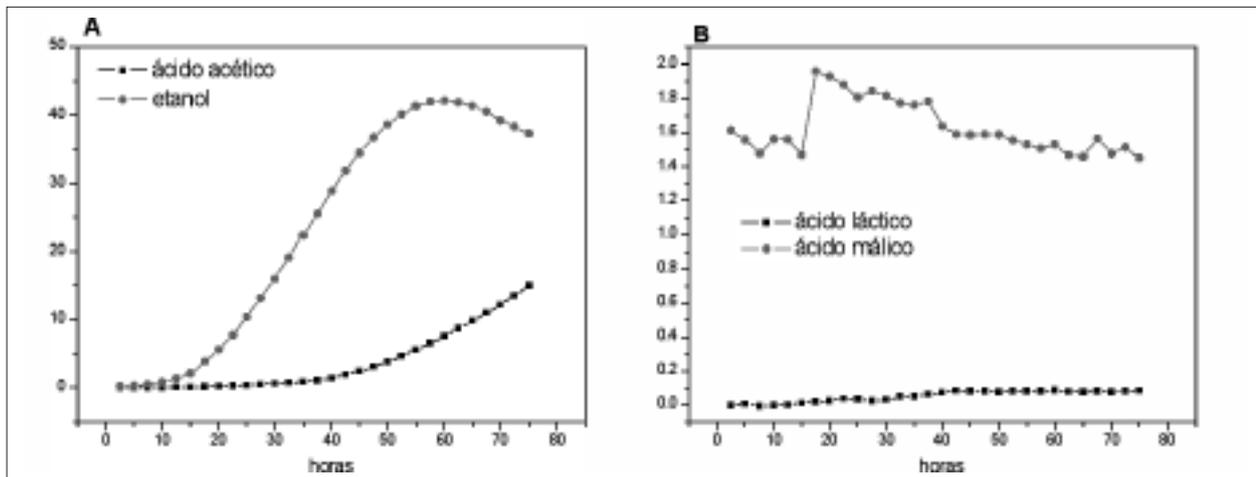
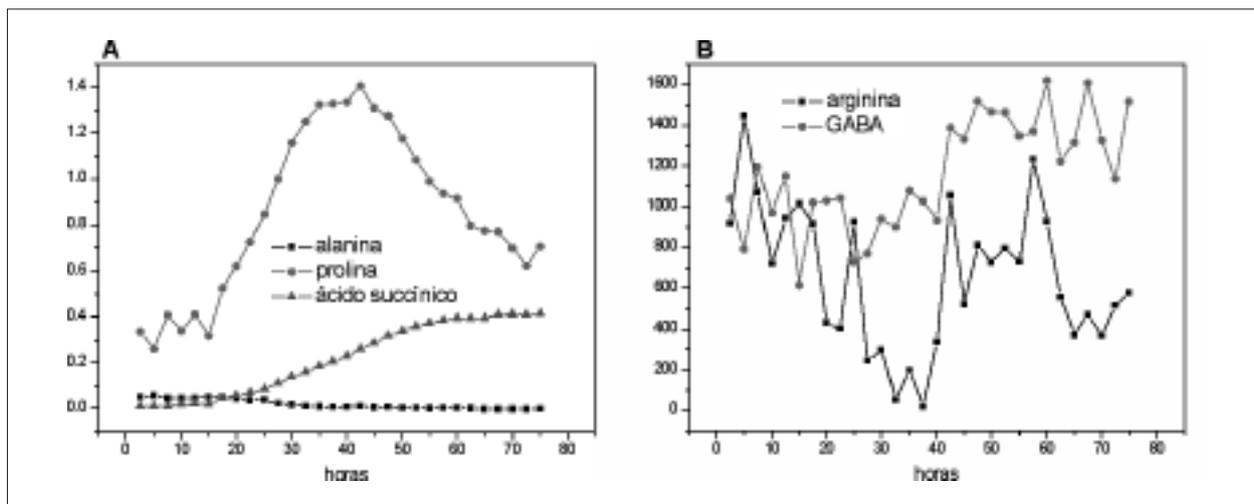




Fig. 4. Evolución de los aminoácidos alanina y prolina y del ácido succínico (gráfica A) y de los aminoácidos arginina y GABA (gráfica B)



ción alcohólica. En la Fig. 2 se muestra siete espectros de ^1H RMN, desde las 2 horas y media hasta las 75 horas, observando claramente la evolución de las señales de etanol y la disminución de las señales correspondiente a los azúcares.

Los espectros una vez registrados fueron escrupulosamente tratados siguiendo el protocolo previamente descrito [4] para aumentar la eficacia de la cuantificación. Se realizó la transformada de Fourier aplicando una función de ventana exponencial con un número de puntos en la parte real de 64K. La corrección de fase se realizó de forma manual y la línea base se ajustó mediante multipuntos.

La cuantificación se efectuó mediante un patrón externo de concentración conocida sobre el que se registró un ^1H RMN en las mismas condiciones que las utilizadas para el seguimiento de la fermentación.

En la Fig. 3 se aportan los datos de la evolución para el etanol y el ácido acético (gráfica A) y para los ácidos málico y láctico (gráfica B). Se observa claramente, que dada las condiciones de fermentación, la aparición de gran cantidad de acético frena la progresión del etanol. Con los mismos experimentos se pudieron realizar los análisis de otros componentes como los que aparecen en la Fig. 4. Los aminoácidos alanina y prolina y el ácido succínico pudieron ser cuantificados mientras que para los aminoácidos arginina y GABA se dan los valores de las integrales absolutas.

4. CONCLUSIONES

Se ha llevado a cabo una microfermentación en un tubo de RMN y dentro del espectrómetro, realizando espectros de forma continua para obtener, aplicando el programa de pulsos adecuado, información cuantitativa de la evolución

de diversos componentes del vino. Se puede realizar un perfecto seguimiento cinético de diversos compuestos sin necesidad de recoger ni alterar la muestra. En futuros trabajos se tratará de controlar el proceso para que la fermentación alcohólica se realice sin la intervención de procesos colaterales.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. www.nobelprice.org
2. 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.
3. Pereira, G. E.; Gaudillere, J.-P.; Van Leeuwen, C.; Hilbert, G.; Lavielle, O.; Maucourt, M.; Deborde, C.; Moing, A.; Rolin, D. 2006. **^1H NMR and Chemometrics To Characterize Mature Grape Berries in Four Wine-Growing Areas in Bordeaux, France.** *J. Agric. Food Chem.* 53, 6382 – 6389.
4. Avenoza, 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.

6. AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la profesora Belén Ayestarán por las muestras aportadas para la elaboración de este trabajo. I. A. agradece al Servicio Riojano de Empleo el contrato. J. H. B. agradece al Ministerio de Educación y Ciencia el contrato Ramón y Cajal.