



MEMORIA DE LAS ACCIONES DESARROLLADAS
PROYECTOS DE MEJORA DE LA CALIDAD DOCENTE
VICERRECTORADO DE PLANIFICACIÓN Y CALIDAD
IX CONVOCATORIA (2007-2008)



❖ **DATOS IDENTIFICATIVOS:**

Título del Proyecto

Seguimiento de los índices de madurez química, fenólica de la uva Pedro Ximénez durante la pasificación como herramienta de aprendizaje interdisciplinar en el modelo del EEES para los estudiantes de Química y Bioquímica Enológica de la licenciatura en Enología

Resumen del desarrollo del Proyecto

El proyecto se desarrolló acorde con los objetivos propuestos en la solicitud y que en el caso de los alumnos eran el desarrollo de competencias propias de cada asignatura, a la vez que se consolidaba el grupo docente. Debido a que no hubo resolución hasta mediados-finales del primer cuatrimestre y dado que una de las asignaturas es cuatrimestral, no se pudo abordar la discusión de los resultados con la amplitud deseada. No obstante, los alumnos expusieron y comentaron los resultados obtenidos en una sesión conjunta y en la que se mantuvo un discurso razonado sobre los mismos. La actividad fue evaluada por los alumnos siendo esta considerada como positiva ya que sirve para consolidar los conocimientos adquiridos en ambas asignaturas. Dada la favorable acogida de la propuesta se ha solicitado un proyecto de mejora de la calidad docente para el curso académico 2008/09 en el que se pretende continuar con estas actividades conjuntas.

Nombre y apellidos

Código del Grupo Docente

Coordinador/a:

RAFAEL ANDRÉS PEINADO AMORES	026
JOSE PEINADO PEINADO	026

Otros participantes:

JUAN JOSE MORENO VIGARA	026
MANUEL TENA ALDAVE	026
ENRIQUETA MOYANO CAÑETE	En Trámite

Asignaturas afectadas

Nombre de la asignatura

QUÍMICA ENOLOGICA
BIOQUIMICA ENOLOGICA

Área de Conocimiento

Edafología y Química Agrícola
Bioquímica y Biología Molecular

Titulación/es

Lcdo. Enología
Lcdo. Enología

MEMORIA DE LA ACCIÓN

1. Introducción.

En la Denominación de Origen Montilla-Moriles, el producto con más relevancia es el vino dulce Pedro Ximénez, que se obtiene a partir del mosto obtenido de uvas parcialmente pasificadas y que termina con la adición de alcohol vínico. La pasificación se realiza en climas cálidos y en particular, la D.O. Montilla-Moriles presenta unas condiciones climáticas excepcionales ya que la uva madura a finales de Agosto y se expone al sol sobre mallas de plástico durante al menos una semana, y todo esto por lo general sucede antes de que comiencen las lluvias de septiembre que podrían alterar la calidad de la uva. Una vez conseguido el grado de pasificación adecuado las uvas se prensan para obtener el mosto y el resto de la uva o pasta, piel y semilla, se emplea como subproducto.

Hasta la fecha no se ha trabajado en la licenciatura de Enología con uvas pasificadas y para su mejor caracterización química y bioquímica, los Departamentos de Química Agrícola y Bioquímica y Biología Molecular decidieron hacer un esfuerzo de forma que se empleara el mismo material y que las sesiones prácticas estuvieran coordinadas, hecho que tampoco sucedía hasta ahora. Es por estas razones por las que decidimos comenzar unas prácticas más integradas entre las asignaturas, ambas de 1º de Enología, para que se diera un conocimiento más global al alumno, así como para que se formara un grupo de docencia en Enología de forma que las actividades prácticas y teóricas estén integradas para dar una visión más completa y por tanto, una formación más acorde a las directrices del Espacio Europeo.

Las asignaturas de Química Enológica y Bioquímica Enológica tenían protocolos de prácticas con los distintos métodos y técnicas de análisis empleadas, y que ha sido necesario modificar y fundir para adaptarlas al estudio de la pasificación en uvas blancas Pedro Ximénez.

2. Objetivos.

- Abordar por primera vez el estudio de la pasificación de la uva Pedro Ximénez en la licenciatura de Enología.
- Establecer un protocolo común para el análisis y seguimiento de la pasificación a partir de la experiencia de las prácticas de las asignaturas Química y Bioquímica Enológica.
- En la elaboración del vino dulce Pedro Ximénez una vez obtenido el mosto por prensado, se le añade alcohol vínico. Se decidió investigar si el alcohol que en vez de añadirlo al mosto se añadiera a la pasta y tras un tiempo de maceración, filtrar y añadirlo al mosto, como experiencia novedosa para que los alumnos estudiaran esta modificación a la elaboración de vino dulce y evaluaran su aportación positiva o negativa en factores como aromas, capacidad antioxidante, etc.
- Formar y consolidar un grupo docente con los profesores de las asignaturas de Química y Bioquímica Enológica.

3. Descripción de la experiencia.

Se hicieron tres muestreos a comienzos de Septiembre para recoger uvas de la variedad Pedro Ximénez de la Cooperativa San Acacio (Montemayor, Córdoba) que habían sido dispuestas en el suelo sobre mallas para su mejor exposición al sol. Las muestras correspondían al día 0, 3 días y 7 días de exposición de las uvas al sol.

Se analizaron una completa serie de parámetros para seguir la pasificación, abarcando desde el punto de vista químico y bioquímico.

- *Realizados en los laboratorios de Química Enológica:* grado brix, pH, acidez titulable, capacidad tampón, acidez volátil.

- *Realizados en los laboratorios de Bioquímica Enológica:* análisis de fenólicos, índice de pardeamiento, fraccionamiento con cartuchos C18, capacidad antioxidante, determinación enzimática de ácido málico y ensayo de la actividad β -glucosidasa.

Además se trató la posible utilización de los macerados con etanol vínico de los hollejos y pepitas sobrantes como parte de la mejora de la elaboración de Pedro Ximénez.

4. Materiales y métodos.

Material para las prácticas de Bioquímica Enológica y Química Enológica

Espectrofotómetros UV-V, cubetas de cuarzo para medida UV, micropipetas, centrífuga así como los reactivos necesarios para la realización de las determinaciones descritas a continuación.

Preparación de la muestra

Se muestrearon al azar 5 kilos de uva Pedro Ximénez de una pasera y correspondientes a los días 0, 3 días y 7 días de exposición de las uvas al sol y se congelaron a -20°C hasta su uso. Por prensado se extrajeron los correspondientes mostos. 10 g de la pasta resultante del prensado se maceraron con 20 ml de etanol durante 24 horas a una temperatura de 30°C.

Determinaciones

- *Determinación de compuestos fenólicos*: se llevo a cabo midiendo la absorbancia a 280 nm de las muestras, los valores se expresaron en mg/L de ácido gálico mediante la extrapolación de la absorbancia en una recta de calibrado donde se represento la absorbancia a 280 nm de distintas concentraciones de ácido gálico.

- *Ensayo de la actividad antioxidante*: empleando el método que mide la inhibición de la decoloración del radical libre ABTS. Este radical coloreado, absorbancia 734 nm, se genera por incubación del ABTS con peroxidisulfato durante al menos 14 horas. Se diluye hasta absorbancia 0,700 y cualquier sustancia con capacidad antioxidante reacciona con el radical disminuyendo la absorbancia que es proporcional a la concentración de antioxidante. Como patrón antioxidante se empleo el Trolox, la forma soluble sintética del tocoferol.

- *Ensayo enzimático del ácido L-málico*: mediante dos reacciones acopladas empleando la L-malato deshidrogenasa (L-MDH) glutamato-oxaloacetato transaminasa (GOT).

- *Ensayo de la actividad enzimática β -glucosidasa*: La actividad β -glucosidasa actúa sobre los residuos de azúcares unidos a distintas moléculas. Los aromas presentes en los vinos pueden liberarse por acción de la enzima y su actividad es inhibida a pH bajos y la máxima actividad es a pH 5. La actividad se mide empleando el p/nitrofenilglucopiranosido, y se detecta el p/nitrofenol liberado por absorbancia a 400 nm. Los μ moles de producto hidrolizado se calcularon por extrapolación de la absorbancia en una recta de p-nitrofenol.

- *Determinaciones enológicas*: pH, acidez titulable, acidez volátil, °brix y capacidad tampón realizadas según los métodos de la UE (CEE, 1990).

5. Resultados obtenidos y disponibilidad de uso.

La pasificación de la uva Pedro Ximénez supone la perdida parcial de agua y por tanto, los compuestos presentes se concentran. La concentración en compuestos fenólicos se incrementa durante la pasificación. Una de las principales características de estos compuestos, que están presentes en todo el reino vegetal, es su capacidad antioxidante y que justifica los efectos beneficiosos de la dieta mediterránea. En los mostos de uvas pasificadas la capacidad antioxidante aumenta en consonancia con los compuestos fenólicos.

Determinación de °Brix, azúcares (g/L), pH, acidez titulable (g de ácido tartárico/L) acidez volátil (g de ácido acético/L), capacidad tampón (meq NaOH/L) y ácido málico (g/L) de mostos procedentes de uva con distinto grado de pasificación.

Muestra	°Brix	Azúcares	pH	Acidez titulable	Ácido málico	Acidez volátil	Capacidad tampón
1	22	261	4.73	1.6	0.16	0.06	14
2	39.3	385	4.62	2.5	0.12	0.42	22.5
3	49.5	475	4.12	3	0.1	0.66	20.5

Una medida del grado de concentración puede obtenerse teniendo en cuenta la cantidad de azúcares al final y al inicio de la pasificación (475 vs 261 g/L). En cuanto al contenido en ácidos, son el ácido málico y el ácido tartárico los mayoritarios en los mostos de uva sana, de modo que la acidez titulable es una medida del contenido en dichos ácidos. El contenido en ácido málico es inferior a 0,2 g/L de modo que el aumento en la acidez titulable es fácilmente explicable por el efecto de la concentración durante la pasificación. En este sentido debemos tener en cuenta también el aumento de la acidez volátil a lo largo de este proceso. En relación con el factor de concentración (≈ 1.8) podemos explicar otros fenómenos como es el aumento de la capacidad antioxidante de los mostos a medida que avanza dicho proceso

Determinación de compuestos fenólicos y fraccionamiento por separación en fase sólida de mostos de Pedro Ximénez durante la pasificación. Extracción con etanol de los compuestos fenólicos de orujos de uvas prensadas.

Análisis espectrofotométrico de fenólicos en mostos de uva durante la pasificación.

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Fenoles totales Unidades de abs 280 nm	26,91	23,25	30,2
Fenoles totales (mg/L de ácido gálico)	2,31	1,995	2,59
Hidroxicinamatos totales	1,96	2,66	3,23
Hidroxicinamatos totales (mg /l de ac. Cafeico)	0,28	0,29	0,31
Flavonoides totales	25,60	17,48	26,1
Pardeamiento del mosto (absorbancia 420 nm)	1,245	2,13	2,9

Separación en fase sólida de compuestos fenólicos y análisis del extracto alcohólico.

Los compuestos fenólicos aunque absorben a 280 nm presentan diferencias en su composición. Mediante separación en fase sólida empleando cartuchos de Sep Pack C18 (Waters) se han separado tres fracciones de compuestos fenólicos y se ha determinado la absorbancia a 280 nm, para determinar la contribución de cada grupo de compuestos fenólicos en la muestra de mosto. Tras activar con metanol el cartucho se equilibró con agua a pH 7. El mosto se ajustó a pH 7 y se aplicaron 0,5 ml al cartucho. La elución se hizo pasando dos veces 2,5 ml de agua a pH 7 (ácidos fenólicos, fracción 1), después se equilibró a pH 2 y se eluyó con acetonitrilo 16% pH 2 (fracción 2, catequinas y procianidinas), y para terminar con metanol pH 2 (fracción 3, procianidinas poliméricas).

El extracto alcohólico se obtuvo tras introducir en tubos de plástico de 50 ml 10 g orujos (restos de la uva tras prensado para obtener el mosto) que se maceraron durante 24 horas a 30°C con 20 ml de etanol al 96%. Se midió la absorbancia a 280 nm del líquido resultante extraído

	Mosto	Fracción 1	Fracción 2	Fracción 3	Extracto alcohólico
Muestra 1	26,9	14,8	6,0	5,6	26,7
Muestra 2	23,3	11,3	4,8	6,4	18,75
Muestra 3	30,2	6,7	7,7	14,8	43,15

La concentración de fenólicos se distribuye entre tres fracciones. Al inicio de la pasificación los mostos de uvas maduras (sin exposición al sol: muestra 1), la fracción de ácidos fenólicos es la más abundante. Conforme avanza la pasificación esta fracción va disminuyendo y aumenta la fracción 3 correspondiente a procianidinas polimerizadas o taninos. Los resultados indican que hay modificaciones en la composición de los compuestos fenólicos en las uvas sometidas a pasificación.

En relación con el extracto alcohólico no se observan diferencias apreciables entre las muestras 1 y 2. Los fenólicos de la muestra 3 aumenta considerablemente en relación con las anteriores, lo cual puede ser interesante porque supone añadir al mosto etanol, que en vez de diluir los compuestos fenólicos del mosto, los incrementa aún más.

Determinación de la capacidad antioxidante.

Se ensayó la actividad antioxidante de las muestras empleando 20 μ l de muestra diluida 5 veces en agua

	Abs. muestra	Abs. control	% inhibición	Conc. equivalente en Trolox (mM)
Muestra 1	0.489	0.633	22.7	3.26
Muestra 2	0.475	0.633	24.9	3.61
Muestra 3	0.393	0.639	38.5	5.78

La capacidad antioxidante es directamente proporcional al grado de pasificación. Esto es posiblemente debido al aumento de concentración de compuestos fenólicos de la uva por pérdida de agua durante la pasificación. Los compuestos fenólicos son antioxidantes, muy abundantes en frutas y verduras.

Ensayo de la actividad β -glucosidasa en mostos procedentes de uva con distinto grado de pasificación.

La actividad β -glucosidasa actúa sobre los residuos de azúcares unidos a distintas moléculas. Los aromas presentes en los vinos pueden liberarse por acción de la enzima y su actividad es inhibida a pH bajos y la máxima actividad es a pH 5. En el caso de la uva, los aromas, y particularmente los terpénicos, están en forma glucosilada por lo que pueden ser sustrato de esta enzima

Con el estudio de la actividad β -glucosidasa se quería comprobar si en la formación de los nuevos aromas detectados en las uvas pasificadas participa esta enzima. Una particularidad de esta enzima es que fuertemente inhibida a pH 3,0 siendo máxima su actividad a pH 5,0.

Se midió la actividad del mosto 1 previamente calentado a 95°C durante 5 minutos y que se empleo como blanco.

Se puso claramente de manifiesto que las uvas cogidas al día 0 presentaban una alta actividad β -glucosidasa e inhibible a pH 3,0. Las uvas expuestas al sol presentaban muy baja actividad independientemente del pH. En definitiva, la aparición de aromas al menos no depende la actividad β -glucosidasa.

	MUESTRA 1		MUESTRA 2	
pH	Actividad β-glucosidasa	%	Actividad β-glucosidasa	%
5	35,62	100	2,21	6,2
4	12,06	21	2,05	5,8
3	6,28	5	1,64	4,6

6. Utilidad.

Este proyecto de mejora de la calidad docente se ha planteado más como una serie de experimentos que como unas prácticas tradicionales. Se ha seguido la evolución de una muestra y se han analizado una serie de parámetros que dan idea de los cambios sufridos por las uvas durante la pasificación.

Los resultados obtenidos han servido para que los alumnos trabajen y piensen sobre un proceso que tiene una alta repercusión económica en la zona. Los alumnos también han elaborado una memoria de prácticas y han podido dar una explicación global de la pasificación mediante los distintos ensayos y técnicas empleadas.

Además se ha planteado un experimento original en el que los alumnos debían abordar la utilidad de la pasta prensada mediante su maceración con etanol, la extracción de compuestos fenólicos y su posible utilidad en la elaboración del vino dulce Pedro Ximénez.

Los alumnos han estado muy implicados en las prácticas, y en el apartado de la maceración de las pastas han diseñado el modo de maceración con un experimento a pequeña escala, y similar al que se emplea en las bodegas.

Por último, este proyecto ha servido para revisar protocolos de prácticas, que servían para uvas normales, pero que han debido ajustarse a las características de las uvas pasificadas.

7. Observaciones y comentarios.

Dado que en la D.O. Montilla-Moriles algunas bodegas están elaborando vino dulce a partir de uvas tintas pasificadas, sería interesante abordar el estudio de las variedades tintas empleadas. En cualquier caso el fraccionamiento de los fenólicos mediante cartuchos SepPack para separación en fase sólida de los mismos así como mejorar la obtención del extracto alcohólico pueden ser muy interesantes para los alumnos, tal y como han sido este año.

8. Autoevaluación de la experiencia.

La autoevaluación de la experiencia se realizó mediante encuesta según el modelo que se expone a continuación.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CONJUNTA ENTRE LAS ASIGNATURAS DE QUÍMICA Y BIOQUÍMICA ENOLÓGICA.

1. Destaque 3 puntos fuertes de la actividad.
 2. Destaque 3 puntos débiles de la actividad
 3. Escriba 3 propuestas para mejorar los puntos débiles
 4. Cite 3 competencias del enólogo que crea haber tratado en esta actividad.
 - 5 ¿Considera que esta experiencia le ha servido para consolidar los conocimientos que ha adquirido durante el desarrollo de ambas asignaturas?
- SI NO No sabe/ No contesta

1. En cuanto a los puntos fuertes los alumnos destacan:

- Se trata un problema real.
- Se aplica la teoría a la práctica.

2. De los puntos débiles destacan:

- Realizar la actividad más al comienzo del primer cuatrimestre. En este sentido, dado que no se tuvo conocimiento de la posibilidad de realizar la experiencia conjunta hasta bien entrado el primer cuatrimestre y teniendo en cuenta que la asignatura de bioquímica enológica se cursa sólo en el primer cuatrimestre el conjunto de los alumnos sugiere una programación de la actividad al inicio del mismo.

3. No se propusieron mejoras.

4. En relación con las competencias tratadas lo alumnos no conocen bien aquellas que corresponden a cada asignatura, pero si identifican los ensayos e investigación realizada como

propias del enólogo. En este sentido, se trataron todas las competencias inicialmente planteadas en el proyecto.

Competencias BOE 179, 26/07/ 2004	Asignatura	Actividad
1. Control de índices de maduración de la uva y todos aquellos procesos que impliquen la realización de muestreos.	Bioquímica	Control de la madurez fenólica y la cinética del pardeamiento de las uvas en la pasera. Análisis enzimático del ácido málico
9. Dirigir laboratorio de análisis físicos, químicos, bioquímicos y organolépticos	Química	Determinación de azúcares, ácidos totales, pH y capacidad tampón de los mostos de uva pasificada.
	Bioquímica	Determinación del contenido en polifenoles y de la capacidad antioxidante de los mostos.
10. Dirigir la obtención de mostos y realizar tratamientos físico-químicos, bioquímicos y enzimáticos previos. Caracterizar la materia prima y el tipo de producto a obtener.	Química	Determinación del ácido glucónico y del grado de podredumbre
	Bioquímica	Ensayo de la actividad enzimática beta-glucosidasa como marcadora de la liberación de sustancias volátiles.
21. Dirigir o realizar investigaciones o ensayos precisos al progreso de la técnica enológica.	Química Bioquímica	Adición del etanol a los orujos para obtener por maceración un suplemento de aromas y polifenoles para el mosto. Análisis de resultados. Extracción de conclusiones. Propuestas de mejora.

5. La totalidad de los alumnos consideró que esta experiencia sirve para consolidar los conocimientos que ha adquirido durante el desarrollo de ambas asignaturas.

9. Bibliografía

- *Determinaciones enológica generales*

CEE (1990). Diario oficial L272 de Octubre de 1990. Editorial Mundi-Prensa, Madrid.

- *Ensayo enzimático del ácido L-málico*

AOAC Official Methods of Analysis (2002). Method 993.05 "L-Malic acid/total malic acid ratio in apple juice". 17th ed., Chapter 37, p. 15.

- *Ensayo de la capacidad antioxidante:*

Re, R., Pellegrini, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.

- *Fraccionamiento en cartuchos C18:*

Oszmianski, J., Ramos, T., & Bourzeix, T. (1998). Fractionation of phenolic compounds in red wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39, 259-262.

- *Ensayo de la actividad β -glucosidasa:*

McCleary, B. V. y Harrington, J. (1988). Purification of β -glucosidase from *Aspergillus niger*. *Methods Enzymology*, 160, 575-583.

Córdoba a 25 de Septiembre de 2008

Rafael A. Peinado Amores

Jose Peinado Peinado