



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 las uvas Pedro Ximénez y Tempranillo 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 como eran el desarrollo de competencias propias de cada asignatura, a la vez que se consolidaba el grupo docente. La única excepción fue que la Cooperativa no pasificó la uva tinta Merlot como se planeó inicialmente sino la Tempranillo. 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 considerada como positiva, al igual que el año pasado, ya que sirve para consolidar los conocimientos adquiridos en ambas asignaturas.

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

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.

El producto de la Denominación de Origen Montilla-Moriles con mayor proyección es el vino dulce Pedro Ximénez, que se obtiene del mosto prensa de las uvas parcialmente pasificadas y que termina con la adición de alcohol vínico. Las condiciones climáticas que se registran en la DO Montilla-Moriles a finales de Agosto permite una pasificación rápida y progresiva de las uvas. Actualmente se elabora vino tinto dulce a partir de uvas tintas Merlot o Tempranillo y empleando el mismo procedimiento que para la uva blanca Pedro Ximenez. 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.

Este es el segundo año que se trabaja en la licenciatura de Enología con uvas pasificadas Pedro Ximenez, pero la primera que se hace con las uvas tintas pasificadas. Para su mejor caracterización química y bioquímica, los Departamentos de Química Agrícola y Bioquímica y Biología Molecular han continuado con la coordinación del material de estudio y de las sesiones prácticas. Las asignaturas que se coordinan son de 1º de Enología y en este año se ha ampliado el número de muestras a analizar y se han incorporado nuevos ensayos para obtener un conocimiento más global al alumno, gracias al grupo de docencia en Enología formado para 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.

Los protocolos de prácticas de las asignaturas de Química Enológica y Bioquímica Enológica se han revisado este año para que estén adaptadas al tipo de muestra de modo que los distintos métodos y técnicas de análisis empleadas para el estudio de la pasificación en uvas blancas Pedro Ximénez y tintas Tempranillo.

Aunque se planeó inicialmente trabajar con uvas tintas Merlot, la Cooperativa donde realizamos los muestreos decidieron elaborar este año vino tinto dulce con uva Tempranillo.

2. Objetivos.

- Continuar con el estudio de la pasificación en uva blanca Pedro Ximénez y abordar por primera vez el estudio de la pasificación de la uva tinta Tempranillo en la licenciatura de Enología.
- Establecer un protocolo común para el análisis y seguimiento de la pasificación a partir de la experiencia del año pasado y coordinando las prácticas de las asignaturas Química y Bioquímica Enológica.
- Al igual que el año pasado, se decidió como experimento comprobar las posibilidades de los extractos etanólicos de la pasta prensa de ambos tipos de uvas y que los alumnos evaluaran las posibilidades de estos extractos etanólicos.
- Formar y consolidar un grupo docente con los profesores de las asignaturas de Química y Bioquímica Enológica.

3. Descripción de la experiencia.

Se hicieron dos muestreos a comienzos de Septiembre para recoger uvas de las variedades Pedro Ximénez y Tempranillo 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 y 6 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, determinación de antocianos totales y coloreados, separación de compuestos fenólicos de mostos de uva tinta mediante separación en fase sólida con cartuchos C18, capacidad antioxidante y determinación enzimática de ácido málico.

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 y Tempranillo.

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 y 6 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 analizó el contenido en compuestos fenólicos mediante 1) lectura directa en el espectrofotómetro a 280 nm, y conocido como Índice de Polifenoles Totales (IPT) y 2) por el ensayo colorimétrico a 760 nm con el reactivo de Folin-Ciocalteu que mide los grupos fenólicos, y conocido como Índice de Folin-Ciocalteu (IFC).

Se elaboraron rectas de calibrado para ambos métodos empleando ácido gálico como patrón, y los valores se expresaron en mg/L de ácido gálico mediante la extrapolación de la absorbancia en dichas rectas de calibrado.

- *Pardeamiento del mosto*: Mediante lectura directa a 420 nm.

- *Intensidad de color*: Suma de las lecturas de absorbancias a 280, 420 y 520 nm.

- *Antocianinas totales (mg/l)* = $20[A^{HCl}_{(520\text{ nm})} - (5/3)A^{SO_2}_{(520\text{ nm})}]$

$A^{HCl}_{(520\text{ nm})}$ Diluir 200 µl hasta 10 ml con HCl 1 M. dejar reposar durante 3 a 4 h a 25°C, y medir la absorbancia a 520 nm en una cubeta de 10 mm de paso de luz. Corregir el valor de la absorbancia multiplicándolo por 10 ml/0,2 ml (factor de dilución).

$A^{SO_2}_{(520\text{ nm})}$ Añadir a la muestra 20 µl de una solución de metabisulfito sódico (MBS) al 20% (p/v) (disolver 0,5 g de MBS en 2,5 ml de agua destilada), mezclar por inversión durante 1 min y volver a medir la absorbancia a 520 nm.

- *Antocianinas coloreadas (ionizadas) (mg/l)* = $20[A_{(520\text{ nm})} - A^{SO_2}_{(520\text{ nm})}]$

- *Porcentaje de antocianinas totales en forma coloreada (ionizada)* = $\text{coloreadas/totales} \times 100$.

- *Separación de compuestos fenólicos mediante cartuchos C18*. Se describe en la sección de Resultados.

- *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. Se ensayó la actividad antioxidante de las muestras empleando 20 µl de muestra diluida 5 veces en agua.

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

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

5. Resultados obtenidos y disponibilidad de uso.

La pasificación de las uvas supone la pérdida 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.

5.1. Determinación de °Be, azúcares (g/L), pH, acidez titulable (meq 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	°Be	Azúcares	pH	Acidez titulable	Ácido málico	Acidez volátil	Capacidad tampón
PX 1	14	262	3.9	21.3	0.295	0.1 g/L	15
PX 2	24.7	580	4.4	41.0	0.245	0.9 g/L	23
Temp 1	13.7	252	3.7	50.5	0.26	0.2 g/L	11
Temp 2	24	570	4.2	95.0	0.15	0.8 g/L	23.5

El contenido inicial en ácido málico es inferior a 0,3 g/L y sólo en la uva Tempranillo se detectó un descenso de este ácido al final de la pasificación.

5.2. Determinación de compuestos fenólicos 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.

Análisis en uvas Pedro Ximenez

Uvas pasificadas Pedro Ximenez	IPT, Fenoles totales A ₂₈₀ nm (mg/L)	IFC, Fenoles totales A ₇₆₀ nm (mg/L)
Muestra 1	103.4	199.0
Muestra 2	654.7	291.5

Extracto etanólico muestra 1	323.1	287.1
Extracto Etanólico 2	371.0	390.0

Análisis en uvas Tempranillo

Uvas pasificadas Tempranillo	IPT, Fenoles totales A ₂₈₀ nm (mg/L)	IFC, Fenoles totales A ₇₆₀ nm (mg/L)
Muestra 1	485.0	350.0
Muestra 2	548.5	481.3

Extracto etanólico M 1	1453.4	1254.7
Extracto etanólico M 2	864.4	792.0

El método de referencia para medida de fenólicos es la medida a 280 nm, IPT, pero no sólo los compuestos fenólicos absorben. El método de Folin, IFC, es específico para los compuestos fenólicos y se han comprobado ambos métodos en las muestras analizadas.

Por efecto de la desecación se concentran todos los compuestos y por tanto los de naturaleza fenólica se incrementan con la pasificación. Este efecto de concentración no es tan notorio en las uvas tintas.

Los extractos etanólicos de hollejos y pepitas las uvas son muy ricos en compuestos fenólicos, particularmente en las uvas tintas.

En cuanto a la comparación de los dos métodos de ensayo, los niveles de compuestos fenólicos determinados por los dos métodos (IPT e IFC) no coinciden, y que llegan a ser muy distintos en el caso de las uvas Pedro Ximenez. Una explicación sería que se formaran compuestos no fenólicos pero con alta absorción a 280 nm, como son los furfurales que se originan a partir de los azúcares en condiciones de laboratorio parecidas a las que hay durante la pasificación.

5.3. Análisis del color y antocianinas en uvas tintas Tempranillo

Uvas pasificadas Tempranillo	Intensidad de color $A_{420} + A_{520}$ nm	Antocianinas totales (mg/L)	Antocianinas coloreadas (mg/L)	% de antocianinas coloreadas
Muestra 1	12.2 (5.0 + 7.2)	56.2	10.3	18.3
Muestra 2	25.2 (13.1 + 12.1)	109.3	26.4	24.2
Extracto etanólico M 1	12.2 (5.92+ 6.28)	54.1	12.4	23.0
Extracto etanólico M 2	4.85 (2.61 + 2.24)	21.6	5.9	27.3

Los prensados de uva Tempranillo dan un ligero color rojo que se incrementan con la pasificación. La componente roja, A_{520} , de los mostos es la principal en la 1ª muestra, día 0, mientras que en la muestra 2. a los 6 días, es la componente amarilla, A_{420} e indicativa de que durante la pasificación las antocianinas deben sufrir algún tipo de reacción.

La concentración de antocianinas es indicadora del ligero tono rojizo de estos mostos, que es al menos la mitad de la que se puede obtener en un vino elaborado con Tempranillo.

El porcentaje de antocianinas coloreadas se incrementa con la pasificación e indica que además de una mayor concentración de antocianinas, durante la pasificación deben ocurrir procesos de estabilización de estos pigmentos

En cuanto a los extractos etanólicos, la materia colorante se extrae en gran cantidad con el etanol en las uvas del día 0, pero tras 6 días de pasificación la cantidad extraída se reduce a un tercio.

5.4. 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 y a 520 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, antocianinas monómeros, catequinas y procianidinas), y para terminar con metanol pH 2 (fracción 3, antocianinas y procianidinas poliméricas). La absorbancia de las muestras y fracciones se midieron tras diluir 1+1 con HCl 0.1 N de forma que todas las fracciones tuvieran igual pH.

	Mosto		Frac. 1		Frac. 2		Frac. 3	
	A280	A520	A280	A520	A280	A520	A280	A520
Muestra Tempr. 1	11.5	51	2.9	1	4.6	28.0	3,1	23.5
Muestra Tempr. 2	12.93	96	3.1	1	5.5	43.0	4,9	56.0

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 antocianinas y catequinas es la más abundante. Conforme avanza la pasificación esta fracción va disminuyendo y aumenta la fracción 3 correspondiente a antocianinas y procianidinas polimerizadas. Los resultados indican que hay modificaciones en la composición de los compuestos fenólicos en las uvas sometidas a pasificación.

5.5. Determinación de la capacidad antioxidante.

Los valores se expresaron como la concentración de Trolox equivalente para ejercer idéntico efecto de inhibición sobre el radical ABTS.

Pedro Ximénez		Tempranillo	
Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2
0.99	1.23	1.68	3.6

La capacidad antioxidante es directamente proporcional a la concentración de compuestos fenólicos, más abundantes en las uvas tintas, y además en nuestro caso también proporcional al grado de pasificación ya que la pérdida de agua conlleva a una concentración de todos los compuestos y entre ellos los fenólicos. Los compuestos fenólicos son antioxidantes, muy abundantes en frutas y verduras.

6. Utilidad.

En este año se ha ampliado el tipo de muestras a uvas blancas y tintas y el 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 las 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.

La maceración de la pasta resultante tras el prensado con etanol y planteada como un experimento original ha servido para que los alumnos puedan comparar y abordar la utilidad de la pasta prensada mediante su maceración con etanol, la extracción de compuestos

fenólicos y su posible utilidad en la elaboración de los vinos dulces elaborados con uva blanca Pedro Ximénez y uva tinta Tempranillo.

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 y comparar entre dos métodos de ensayo de compuestos fenólicos totales, se ha ampliado a los ensayos colorimétricos para uvas tintas, y ambos han debido ajustarse a las características de las uvas pasificadas.

7. Observaciones y comentarios.

De la experiencia de estos dos años los alumnos han podido comprender la compleja naturaleza de los compuestos presentes en la composición de los mostos y los extractos etanólicos de la pasta prensada. Se han hecho ensayos específicos para fenólicos y antocianinas y se han podido separar los compuestos fenólicos de las muestras de uvas tintas mediante su separación por cartuchos C18 para separación en fase sólida. Este hecho ha sido muy didáctico puesto que permite cuantificar colorimétricamente un compuesto sino asignar su posible naturaleza química.

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:
 - Toma de contacto de cómo influye ciertos tratamientos prefermentativos con la evolución de distintos parámetros enológicos.
2. De los puntos débiles destacan:
 - A ser posible realizar las determinaciones enológicas al comienzo de la actividad.
3. No se propusieron mejoras.
4. Al igual que el año pasado, los alumnos no tienen conocimiento exacto de las competencias tal y como están recogidas en el BOE, pero si creen las determinaciones realizadas son labor propia del enólogo. En este sentido, se trataron todas las competencias inicialmente planteadas en el proyecto.

Actividad a realizar por el alumno	Asignatura	Competencias BOE 179, 26/07/ 2004
Seguimiento de la pasificación y cinética del pardeamiento de las uvas en la pasera. Análisis enzimático del ácido málico	Bioquímica	1. Control de índices de maduración de la uva y todos aquellos procesos que impliquen la realización de muestreos.
Determinación de azúcares, ácidos totales, pH y capacidad tampón de los	Química	9. Dirigir laboratorio de análisis físicos, químicos, bioquímicos y organolépticos

mostos de uva pasificada obtenidos a los largo de la pasificación.		
Determinación del contenido en polifenoles y de la capacidad antioxidante de los mostos.	Bioquímica	
Determinación del ácido glucónico y del grado de podredumbre	Química	10. Dirigir la obtención de mostos y realizar tratamientos fisico-químicos, bioquímicos y enzimáticos previos. Caracterizar la materia prima y el tipo de producto a obtener.
Determinación de flavonoides y proantocianidinas	Bioquímica	
Adición del etanol a los orujos para obtener por maceración un suplemento de aromas y polifenoles para el mosto. Comparación de mostos con y sin adición de extracto alcohólico.	Química Bioquímica	21. Dirigir o realizar investigaciones o ensayos precisos al progreso de la técnica enológica.

5. Los alumnos consideró que esta experiencia consolida los conocimientos que adquiridos 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.

Córdoba a 25 de Septiembre de 2009

Rafael A. Peinado Amores

Jose Peinado Peinado