Universitat de Girona

INCIDÈNCIA DE MICROORGANISMES I DE COMPOSTOS ORGÀNICS VOLÀTILS EN L'APARICIÓ DE DEFECTES SENSORIALS EN SURO

Chantal PRAT I BOTANCH

ISBN: 978-84-693-3241-2
Dipòsit legal: GI-554-2010
http://hdl.handle.net/10803/7878

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Universitat de Girona

TESI DOCTORAL

INCIDÈNCIA DE MICROORGANISMES I DE COMPOSTOS ORGÀNICS VOLÀTILS EN L'APARICIÓ DE DEFECTES SENSORIALS EN SURO

Chantal Prat i Botanch

2009

Universitat de Girona

TESI DOCTORAL

INCIDÈNCIA DE MICROORGANISMES I DE COMPOSTOS ORGÀNICS VOLÀTILS EN L'APARICIÓ DE DEFECTES SENSORIALS EN SURO

Memòria presentada per Chantal Prat i Botanch, inscrita al programa de doctorat en Biotecnologia, per optar al grau de Doctora en Ciències Químiques.

Dirigida per Dr. Lluís Bañeras i Dra. Enriqueta Anticó.

2009

Lluis Bañeras i Vives professor titular de l'Institut d'Ecologia Aquàtica de la Universitat de Girona i Enriqueta Anticó i Daró, professora titular del Departament de Química de la Universitat de Girona,

CERTIFIQUEM:

Que aquest treball titulat **"Incidència de microorganismes i de compostos orgànics volàtils en l'aparició de defectes sensorials en suro"**, que presenta Chantal Prat i Botanch, per a l'obtenció del títol de Doctora, ha estat realitzat sota la nostra direcció a les àrees de Microbiologia i de Química Analítica, i que constitueix la seva memòria de Tesi doctoral per optar al grau de Doctor en Ciències, especialitat Química, per la Universitat de Girona.

Girona, juliol de 2009

Dr. Lluís Bañeras i Vives

Dra. Enriqueta Anticó i Daró

La realització d'aquest treball ha estat possible gràcies a una beca predoctoral d'accions especials UdG-BRAE (04/03) concedida per l'Ajuntament de Palafrugell i la Universitat de Girona. Agraïm a les empreses TESA, Geyru S.A i J. Vigas el proporcionar-nos les mostres de suro.

RESUM

La incidència sobre el suro de defectes sensorials amb descriptors de florit-humitat és un dels principals problemes amb què s'enfronta la indústria surera. Juntament amb el ben conegut 2,4,6-tricloroanisole (TCA), han aparegut altres compostos volàtils amb descriptors que es relacionen amb aquest defecte en anàlisis fetes en vins i taps de suro, com per exemple les metoxipirazines, la geosmina o el metilisoborneol. Aquesta recerca s'ha fet amb l'objectiu principal d'aprofundir en els mètodes de determinació de compostos volàtils en mostres de suro per així dotar a les empreses sureres d'eines per a la detecció d'un nombre suficient de compostos per identificar possibles defectes de florit-humitat. A més, el fet que la majoria dels compostos d'interès tingui un origen microbià ha fet necessari completar les anàlisis químiques amb mètodes de detecció i aïllament dels microorganismes susceptibles de produir-los.

Per tal d'assolir aquest objectiu s'ha desenvolupat i avaluat una metodologia basada en la microextracció en fase sòlida (SPME) i la cromatografia de gasos per a l'anàlisi conjunta de TCA, 3-isopropil-2-metoxipirazina, geosmina i 2-metilisoborneol en macerats de suro. S'han avaluat les condicions de temperatura i temps d'extracció i la naturalesa del recobriment de la fibra. Les condicions de treball escollides han estat l'extracció a 50º C durant 30 minuts utilitzant la fibra combinada CAR-DVB-PDMS. L'aplicació d'aquest mètode a mostres reals de suro amb marcades desviacions sensorials ha posat de manifest la presència de TCA i guaiacol en la majoria d'elles. Amb aquest mètode s'aconsegueix la determinació simultània de diversos compostos de manera senzilla i proporciona una eina d'anàlisi útil i ràpida per a la indústria surera i els cellers.

Aquest mateix mètode s'ha aplicat, amb lleugeres variacions, per a la caracterització de la fracció volàtil en macerats de suro amb diferents tipus de desviacions sensorials (TCA, florit-humitat, vegetal, químic) i en mostres control sense defecte. S'ha ampliat l'anàlisi a 20 compostos que es determinen de forma simultània i semiquantitativa. Un tractament estadístic mitjançant anàlisi multivariant de les dades obtingudes ha permès

diferenciar els diferents grups de defectes amb un grau de fiabilitat elevat. D'aquesta manera s'han pogut establir 5 compostos discriminants: TCA, alcohol fenquílic, 1-octen-3-ol, alcohol benzílic i benzotiazole. L'anàlisi de només 5 d'aquests compostos permet detectar la presència de defectes en el suro i proporciona una eina de treball objectiva per a la classificació de taps, útil com a complement de l'anàlisi sensorial per a les empreses sureres.

És interessant remarcar que el principal origen d'aquests compostos causants de desviacions sensorials (cloroanisoles, pirazines...) és l'activitat biològica de fongs i bacteris. Els anisoles es produeixen biològicament per la metilació dels corresponents substrats fenòlics, reacció freqüent en molts fongs aïllats de suro. Les pirazines, en canvi, poden tenir un origen biològic o bé derivar de reaccions químiques dependents de la temperatura. L'estudi dels processos de transformació i aparició de males olors en suro no pot obviar-ne el seu origen i per tant és necessària l'anàlisi dels microorganismes potencialment responsables d'aquesta activitat com a complement als mètodes químics d'anàlisi. Amb aquesta finalitat s'ha utilitzat un mètode per a l'estudi de la diversitat de fongs i bacteris en mostres de suro basat en l'estudi de marcadors genètics mitjançant l'anàlisi en gradients electroforètics desnaturalitzants (DGGE, *Denaturing gradient gel electrophoresis*). La DGGE és una tècnica molt utilitzada en ecologia microbiana i permet realitzar la identificació dels microorganismes presents en una mostra en base a la separació i seqüenciació de marcadors genètics coneguts. Els marcadors genètics utilitzats han estat el gen 16S rRNA per als bacteris i el fragment intergènic ITS1 per als fongs. S'han utilitzat per a l'estudi tres classes sensorials de taps i discs: florit-humit clarament identificable com a TCA (ME-TCA), florit-humit no relacionat amb TCA (ME) i mostres sense defecte (C). S'han analitzat dos tipus de mostres, discs de suro i taps de cava, com a representació d'una etapa intermèdia i final del procés de fabricació de taps, respectivament.

L'anàlisi química d'aquestes mostres ens ha permès detectar quantitats per sobre del nivell de detecció de TCA, guaiacol i 2-metoxi-3,5-dimetilpirazina (MDMP), únicament.

Respecte a l'anàlisi microbiològica, en la majoria de casos, les desviacions de tipus TCA en discs de suro coincidien amb la presència de *Penicillium variabile*. Per tal de confirmar la seva implicació en la producció de TCA s'han incubat aïllats amb seqüències del fragment ITS1 100% idèntiques a les recuperades sobre suro no modificat. En molts casos, aquests microorganismes han estat capaços de produir TCA en suro, fet que demostra la seva implicació en l'aparició de males olors. L'anàlisi de taps amb desviacions de tipus florit-humitat sense presència de TCA (ME) mostrava una estructura de la comunitat microbiana complexa, amb microorganismes exclusius com el fong *Eurotium repens* i els bacteris *Novosphingobium subarcticum, Sphingobium* spp., *Acinetobacter lwofii, i Pseudomonas* spp. En aquest cas, no es podia associar l'aparició de desviacions sensorial a un microorganisme concret i es suposa un procés més complex, en el que hi contribuirien diferents microorganismes amb capacitat de producció i de degradació d'alguns volàtils. Els resultats de l'estudi de la comunitat bacteriana de les mostres control apunten també a la presència de fenòmens de degradació. En aquestes mostres es detecten de forma selectiva algunes soques de *Pseudomonas aeruginosa* i *P. putida* que, juntament amb alguns *Actinobacteria,* suggereixen que aquests microorganismes puguin veure's implicats en la degradació dels compostos causants de defecte.

Per últim s'ha avaluat la capacitat de producció de defectes sensorials per microorganismes aïllats de suro utilitzant tècniques olfactomètriques. Aquestes tècniques permeten detectar els compostos "aroma-actius" dintre d'una fracció volàtil complexa. Es van aïllar soques de llevats, fongs filamentosos i bacteris de mostres de suro classificat com a defectuós sensorialment i es va estudiar la capacitat dels microorganismes aïllats de desenvolupar compostos causants de defectes sensorials en tres matrius de suro diferents (granulat de suro, taps aglomerats i taps naturals). Després de 30 dies d'incubació es realitzava l'anàlisi sensorial i olfactomètrica dels macerats. La majoria dels aïllats van ser capaços de produir desviacions sensorials en suro en diferents graus. En aquest estudi s'incloïen mostres amb els següents descriptors sensorials: controls, florit-humitat, florit-humitat-TCA i aromes vegetals i químics.

RESUM

La major incidència de desenvolupament de defectes sensorials es trobava en els assaigs de mostres inoculades amb fongs. Tot i així existia una alta heterogeneïtat dins d'una determinada espècie de fong pel que fa a la capacitat de desenvolupar defectes: mentre un dels aïllats de *Penicillium glabrum* no produïa defectes sensorials en cap de les matrius estudiades, un altre aïllat de la mateixa espècie apareixia entre els que presentaven més capacitat de producció de defectes; aquest fet indica que és necessària una anàlisi a nivell de soca per definir un organisme aïllat com un possible productor de defectes.

Els bacteris mostraven una incidència relativament menor en el desenvolupament de compostos causants de defectes. Dintre d'aquests, soques de *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas jessenii* i *Stenotrophomonas maltophilia* són les que presentaven major incidència.

Els tipus de mostres de suro influïa en els resultats dels experiments d'incubació. El suro granulat va ser el substrat més sensible al desenvolupament d'olors desagradables, mentre que el suro natural era el material que menys problemes presentava en aquest sentit.

Els defectes que han aparegut més sovint en les anàlisis sensorials dels incubats han estat florit-humit, florit-humit-TCA i vegetals, i és per això que es van seleccionar aquests macerats per analitzar-los mitjançant cromatografia de gasos-olfactometria (GC-O) i cromatografia de gasos-espectrometria de masses (GC-MS). També es van incloure mostres control consistents en suro granulat no-inoculat incubades en les mateixes condicions experimentals. El suro control presenta un perfil aromàtic amb múltiples notes que poden dificultar la detecció dels compostos "aroma actius" propis de cada classe establerta, i per tant l'anàlisi sensorial i l'olfactometria. La mostra de macerat amb una nota florit-humit presentava com a particularitat una alta intensitat de 2-metoxi-3,5-dimetilpirazina, i la presència en exclusiva de 2-metilisoborneol i geosmina. En la mostra descrita sensorialment com a vegetal, destacava la presència d'octanal (que no s'ha

trobat en cap altre macerat) i, de nou, 2-metoxi-3,5-dimetilpirazina. Per últim, a la mostra amb la nota de florit-humit-TCA s'ha trobat, com era d'esperar TCA, present a una intensitat elevada, i dos altres compostos no identificats amb descriptors de florit.

L'anàlisi química dels macerats només ha permès la quantificació de TCA i guaiacol, mentre que la majoria de odorants trobats en les anàlisis olfactomètriques com l'octanal, la MDMP i el Z-2-nonenal no han pogut ser quantificats pel mètode GC-MS utilitzat. Aquest fet demostrava la potencialitat de la GC-O per caracteritzar mostres amb odorants a molt baixa concentració que són difícils de detectar mitjançant l'anàlisi amb GC-MS.

RESUMEN

La incidencia de defectos sensoriales con descriptores de moho-humedad es uno de los principales problemas con los que se enfrenta la industria del corcho. Junto con el ampliamente estudiado 2,4,6-tricloroanisole (TCA), han aparecido otros compuestos volátiles con descriptores aromáticos que se relacionan con este defecto, en análisis realizados en vinos y tapones de corcho. Entre los compuestos más citados están, por ejemplo, las metoxipiracinas, la geosmina y el metilisoborneol. Sin embargo, los trabajos orientados al estudio de su origen y cuantificación en corcho y vino son relativamente escasos. Por este motivo, esta investigación se ha llevado a cabo con el objetivo principal de profundizar en los métodos de determinación de compuestos volátiles en muestras de corcho para así dotar a las empresas corcheras de herramientas con las que detectar un número suficiente de compuestos a fin de identificar posibles desviaciones sensoriales de tipo moho-humedad. Además, el hecho de que la mayoría de los compuestos de interés tenga un origen microbiano nos ha llevado a completar los análisis químicos con métodos de detección y aislamiento de microorganismos susceptibles de producirlos.

Para alcanzar este objetivo se ha desarrollado y evaluado una metodología basada en la microextracción en fase sólida (SPME) y en la cromatografía de gases para el análisis conjunto de TCA, 3-isopropil-2-metoxipiracina, geosmina y 2-metilisoborneol en macerados de corcho. Se ha evaluado la influencia de las condiciones de temperatura y tiempo de extracción así como la naturaleza del recubrimiento de la fibra. Las condiciones de trabajo escogidas han sido la extracción a 50º C durante 30 minutos utilizando la fibra combinada CAR-DVB-PDMS. La aplicación de este método a muestras reales de corcho con marcadas desviaciones sensoriales ha puesto de manifiesto la presencia de TCA y guaiacol en la mayoría de ellas. Con este método se consigue la determinación simultánea de varios compuestos de manera sencilla, proporcionando una herramienta de análisis útil y rápida para la industria del corcho y las bodegas.

Este mismo método se ha aplicado, con ligeras variaciones, a la caracterización de

la fracción volátil de macerados de corcho con diferentes tipos de desviaciones sensoriales (TCA, moho-humedad, vegetal y química) y en muestras de corcho control sin alteraciones apreciables de su aroma. Se ha ampliado el análisis químico a un total de 20 compuestos volátiles que se determinan de forma simultánea y semicuantitativa. El tratamiento estadístico mediante análisis multivariante de los datos obtenidos ha permitido diferenciar los distintos grupos de defectos con un grado de fiabilidad elevado. De esta forma se han podido establecer 5 compuestos discriminantes: TCA, alcohol fenchílico, 1-octen-3-ol, alcohol bencílico y benzotiazol. El análisis de sólo estos 5 compuestos permite detectar la presencia de defectos en el corcho y proporciona una herramienta de trabajo objetiva para la clasificación de tapones, útil como complemento del análisis sensorial para las empresas corcheras.

Una de las causas que dan lugar al origen de los compuestos causantes de desviaciones sensoriales (cloroanisoles, piracinas...) es la actividad biológica de hongos y bacterias. Los anisoles, por ejemplo, se producen biológicamente mediante la metilación de los correspondientes sustratos fenólicos, reacción frecuente en muchos hongos aislados de corcho. Las piracinas, en cambio, pueden tener un origen biológico, relacionado con el metabolismo de los aminoácidos, o bien derivar de reacciones químicas dependientes de la temperatura. El estudio de los procesos de transformación y aparición de malos olores en corcho no puede obviar su origen y, por tanto, es necesario el análisis de los microorganismos potencialmente responsables de esta actividad como complemento de los métodos químicos de análisis. Con esta finalidad se ha utilizado un método para el estudio de la diversidad de hongos y bacterias en muestras de corcho basado en el análisis de marcadores genéticos mediante gradientes electroforéticos desnaturalizantes (DGGE, *Denaturing gradient gel electrophoresis*). La DGGE es una técnica muy utilizada en ecología microbiana y permite realizar la identificación de los microorganismos presentes en una muestra mediante la separación y secuenciación de marcadores genéticos conocidos. Los marcadores genéticos utilizados han sido el gen 16S rRNA para bacterias y el fragmento intergénico ITS1 para los hongos. Se han utilizado para el estudio tapones para cava y discos de corcho, clasificados en tres clases sensoriales:

moho-humedad claramente identificable como TCA (ME-TCA), moho-humedad no relacionado con TCA (ME) y muestras sin defecto (C). El tipo de muestras, discos de corcho natural y tapones de cava, se han escogido como representantes de una etapa intermedia y final del proceso de fabricación de tapones, respectivamente.

El análisis químico de estas muestras nos ha permitido detectar cantidades por encima del nivel de detección de TCA, guaiacol y 2-metoxi-3,5-dimetilpiracina (MDMP), únicamente. Respecto al análisis microbiológico, en la mayoría de casos las desviaciones de tipo TCA en discos de corcho coincidían con la presencia de *Penicillium variabile*. La implicación de esta especie en la formación de TCA se ha confirmado a partir de la incubación de aislados en matrices de corcho. La identificación de los aislados y su perfecta coincidencia con las especies detectadas en corcho mediante DGGE se ha asegurado a partir de la homología (100%) entre las secuencias del fragmento ITS1 recuperadas. El análisis de tapones con desviaciones de tipo moho-humedad sin presencia de TCA (ME) mostraba una estructura de la comunidad microbiana compleja, con microorganismos exclusivos como el hongo *Eurotium repens* y las bacterias *Novosphingobium subarcticum*, *Sphingobium* spp., *Acinetobacter lwofii* y *Pseudomonas* spp. En este caso no se podía asociar la aparición de desviaciones sensoriales a un microorganismo concreto y se supone un proceso más complejo en el que contribuirían diferentes microorganismos con capacidad de producción y de degradación de algunos volátiles. Los resultados del estudio de la comunidad bacteriana de las muestras control apuntan también a la presencia de fenómenos de degradación. En estas muestras se detectan de forma selectiva algunas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *P. putida* que, junto con algunos *Actinobacteria*, sugieren que estos microorganismos puedan verse implicados en la degradación de los compuestos causantes de defecto.

Por último se ha evaluado la capacidad de producción de defectos sensoriales en deferentes aislados microbianos (13 hongos filamentosos, 6 levaduras y 19 bacterias) utilizando técnicas olfatométricas. Estas técnicas permiten detectar los compuestos "aroma-activos" dentro de una fracción volátil compleja. Se aislaron cepas de levaduras,

hongos filamentosos y bacterias de muestras de corcho clasificado como defectuoso sensorialmente y se estudió la capacidad de los microorganismos aislados de desarrollar compuestos causantes de defectos sensoriales en tres matrices de corcho diferentes (granulado de corcho, tapones aglomerados y tapones naturales). Después de 30 días de incubación se realizaba el análisis sensorial y olfatométrico de los macerados. La mayoría de los aislados fueron capaces de producir desviaciones sensoriales en corcho en diferentes grados. En este estudio se incluían muestras con los siguientes descriptores sensoriales: controles, moho-humedad, moho-humedad-TCA y aromas vegetales y químicos.

La mayor incidencia de desarrollo de defectos sensoriales se encontraba en los ensayos de muestras inoculadas con hongos. Sin embargo, existía una alta heterogeneidad dentro de una determinada especie de hongo en cuanto a la capacidad de desarrollar defectos: mientras uno de los aislados de *Penicillium glabrum* no producía defectos sensoriales en ninguna de las matrices estudiadas, otro aislado de la misma especie aparecía entre los que presentaban mayor capacidad de producción de defectos. Este hecho indica que la identificación de un aislado como una especie determinada no implica necesariamente su capacidad de producir desviaciones sensoriales y que estudios a nivel de cepa son, por tanto, necesarios.

Las bacterias mostraban una incidencia relativamente menor en el desarrollo de compuestos causantes de defectos. Dentro de éstas, cepas de *Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas jessenii* y *Stenotrophomonas maltophilia* eran las que presentaban una mayor incidencia.

La tipología de la matriz de corcho utilizada influía en los resultados obtenidos en los experimentos de incubación. El corcho granulado fue el sustrato más sensible al desarrollo de olores desagradables, mientras que el corcho natural fue el material que menos problemas presentó en este sentido.

Los defectos que han aparecido más a menudo en los análisis sensoriales de los incubados han sido moho-humedad, moho-humedad-TCA y vegetales; y es por ello que se seleccionaron estos macerados para ser analizados mediante cromatografía de gases-olfatometría (GC-O) y cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS). También se incluyeron controles consistentes en corcho granulado no inoculado, incubado en las mismas condiciones experimentales. El corcho control presentaba un perfil aromático con múltiples notas que podrían dificultar la detección de los compuestos "aroma activos" propios de cada grupo establecido así como el análisis sensorial. Las muestras de macerado con una nota moho-humedad presentaban como particularidad una alta intensidad de 2-metoxi-3,5-dimetilpiracina, y la presencia en exclusiva de 2-metilisoborneol y geosmina. En las muestras descritas sensorialmente como vegetal destacaba la presencia de octanal (que no se había encontrado en ningún otro macerado) y, de nuevo, 2-metoxi-3,5-dimetilpiracina. Por último, en la muestra con la nota de moho-humedad-TCA se ha encontrado TCA a una intensidad elevada y otros dos compuestos no identificados con descriptores tipo moho.

El análisis químico de los macerados sólo permitió la cuantificación de TCA y guaiacol, mientras que la mayoría de odorantes clave encontrados en los análisis olfatométricos como el octanal, la MDMP y el Z-2-nonenal no pudieron ser cuantificados por el método GC-MS utilizado. Este hecho demostró la potencialidad de la GC-O para caracterizar muestras con odorantes a muy baja concentración que son difíciles de detectar mediante el análisis con GC-MS.

RESUMEN

SUMMARY

The incidence of musty-earthy sensory deviations on cork is one of the main problems that the cork industry faces. Along with the well known 2,4,6-trichloroanisole (TCA), other volatile compounds with aromatic descriptors related to this defect, such as methoxypyrazines, geosmin and methylisoborneol, have been described recently in wine and cork. The aim of this research work was to develop analytical methods to simultaneously determine a large set of volatile compounds in cork samples in order to provide cork companies with a tool to identify possible musty-earthy sensory deviations. Moreover, the microbial origin of most of these compounds makes necessary to complement the chemical analysis with the detection and isolation of microorganisms that may be involved in the production of off-odours.

A methodology based on solid phase microextraction (SPME) and gas chromatography for the determination of TCA, 3-isopropyl-2-methoxypyrazine, geosmin and 2- methylisoborneol in cork aqueous macerates has been developed and validated. The influence of temperature, extraction time and fibre coating on the chromatographic response of TCA, GSM, MIB and IPMP has been evaluated. The chosen experimental conditions for a convenient detection and quantification of the target molecules were the extraction at 50º C for 30 minutes using a DVB-CAR-PDMS fibre. The application of this method to real cork samples with marked sensory deviations has revealed the presence of TCA and guaiacol (GUA) in most of them. This method was stated as the basis to allow the simultaneous determination of several compounds in a simple way and may provide cork industries and warehouses with a useful and quick analysis tool.

The HS-SPME-GC-MS method has been applied -with slight variations- to the characterization of the volatile fraction of cork macerates with different types of sensory deviations (TCA, musty-earthy, vegetative, chemical...) and of control cork samples without detected deviations. We have extended the analysis to 20 additional compounds

that were determined in a simultaneous and semi quantitative way. A statistical treatment through multivariate analysis of the obtained chromatographic data allowed the distinction of the "a priori" made sensory groups with a high degree of reliability. We have found 5 discriminating compounds: TCA, fenchyl alcohol, 1-octen-3-ol, benzyl alcohol and benzothiazole. The mere determination of those 5 compounds were, therefore, stated as a analytical shortcut to detect the presence of different sensory deviations in cork, providing an objective working tool to classify cork stoppers, which is useful to cork companies as a sensory analysis complement.

Biological activity of bacteria and fungi is commonly regarded as one of the possible origins of volatile compounds (chloroanisoles, pyrazines ...) that may lead to unpleasant aromas. Anisoles are biologically produced by the methylation of the corresponding phenolic substrates and is a fairly common reaction found in many fungi isolated from cork. Pyrazines may be biologically produced from side reactions of the regular amino acid metabolism, although alternative origins derived from temperature dependant chemical reactions are also assumed. Regular fingerprinting techniques for the analysis of microbial diversity such as Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) have been applied to the study of microorganism potentially responsible for off-odour formation in cork, in order to complement the chemical characterization of the volatile fraction. DGGE is a widely used technique in microbial ecology which, based on the separation and sequencing of known genetic markers, allows the identification of the microorganisms present in a sample. The used genetic markers were the 16S rRNA gene for bacteria and the ITS1 intergenic fragment for fungi. Three classes of sensory discs and cork stoppers : musty-earthy -clearly identifiable as TCA (TCA-ME)-; musty-earthy not related to TCA (ME); and samples without deviation (C) and two sample types:discs and cork stoppers for sparkling wine, were used in the study. Cork discs and finished twin-top agglomerated cork stoppers were chosen as representative samples of an intermediate and a final stage of the cork stoppers manufacturing process, respectively.

The chemical analysis of these samples has only allowed us to detect quantities

above detection level of TCA, guaiacol and 2-methoxy-3,5-dimethylpyrazine (MDMP). In most of the analyzed corks the TCA deviations in cork discs have coincided with the presence of the filamentous fungi *Penicillium variabile*. In order to confirm the implication of the detected fungi in the production of TCA, additional incubation experiments were performed using isolated pure cultures of the same species. Perfect coincidence of isolates with *in situ* detected fungi was obtained through comparison of genomic ITS1 gene sequences (100% homology). In many cases, these microorganisms were able to produce TCA in cork, which shows their involvement in the off-odours development. The analysis of non TCA containing -musty-earthy cork stoppers showed a complex structure of the microbial community with the exclusive presence of the fungi *Eurotium repens* and the bacteria *Novosphingobium subarcticum*, *Sphingobium* spp., *Acinetobacter lwofii* and *Pseudomonas* spp. In this case, sensory deviations could not be associated to a specific microorganism and a more complex process was supposed to occur involving different microorganisms and opposite production and degradation reactions. The results of the study of the bacterial community of control samples also indicated the presence of degradation processes. Some specific Pseudomonas *aeruginosa* and *P. putida* were selectively detected in these samples which, together with some *Actinobacteria*, suggested that these microorganisms could be involved in the degradation of the compounds causing deviations.

Finally we have evaluated the off-odour production capacity of microorganisms isolated from cork using olfactometry techniques. These techniques allow the detection of “aroma-active” compounds within a complex volatile fraction. 38 pure cultures of yeast (6), filamentous fungi (13) and bacteria (19) have been obtained from cork samples with sensory deviations and tested for their capacity to develop unpleasant odours in three cork matrices (granulated cork, agglomerated cork stoppers and natural cork stoppers). After 30 days of incubation, sensory and olfactometric analyses of macerates were carried out. Most isolates were able to produce sensory deviations in cork in different extent, which were described as musty-earthy, musty-earthy-TCA, vegetative and chemical aromas.

SUMMARY

The highest incidence of sensory deviations was found in tests where fungi were inoculated. However a high heterogeneity within different isolates of the same species was obtained. This strain specific effect in terms of off-odour production was found for the fungi *Penicillium glabrum* and the bacteria *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* and *Stenotrophomonas maltophilia*. The performed experiments indicate that we must be cautious in labelling off-odour production responsible microorganisms only trough their identification by phylogenetic markers.

The bacteria have showed a relative lower incidence in the development of off-odour compounds. Among these, strains of *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas jessenii* and *Stenotrophomonas maltophilia* have had a higher incidence in the development of sensory deviations.

Moreover, sensitivity to off-odour production and accumulation may vary from different types of cork matrices. Granulated cork has been shown to be the most sensitive to the off-odours development regardless of the microbial group inoculated and contrasted with natural cork, which was evaluated as the safer material. The deviations most commonly found in the incubation experiments by sensory analyses were musty-earthy, musty-earthy-TCA and vegetative; so we have selected these macerates to be analyzed by gas chromatography-olfactometry (GC-O) and gas chromatography-mass spectrometry. We have also included control samples consisting in non-inoculated granulated cork, incubated under the same experimental conditions. The control cork had a profile with multiple aromatic notes which can hinder the detection of "aroma active" compounds of each established sensory-class and make sensory and olfactometric analyses more difficult. Macerates having a musty-earthy note were shown to bear a high intensity of 2-methoxy-3,5-dimethylpyrazine and the exclusive presence of 2-methylisoborneol and geosmin. Samples sensorially described as vegetative were characterized by the presence of octanal (which has not been found in any other macerate) and 2-methoxy-3,5-dimethylpyrazine. Finally TCA was found -as expected- at a

high intensity in the musty-earthy-TCA note samples, along with two other unidentified compounds with musty descriptors.

The chemical analysis of macerates only allowed the quantification of TCA and guaiacol, while most of the key odorants found in the olfactometric analysis, such as octanal, MDMP and Z-2-nonenal- were not detected above the quantification limit with the used GC-MS method. This fact demonstrated the potential of GC-O in order to characterize samples with odorants at very low concentrations.

SUMMARY

PUBLICACIONS

A continuació exposo la memòria que constitueix la meva tesi doctoral, la qual es presenta com a compendi de publicacions. Els següents articles, que s'adjunten al capítol 3, conformen el cos central d'aquesta memòria.

Prat C., Trias R., Culleré L., Escudero A., Anticó E., Bañeras L. 2009, Off-Odor Compounds Produced in Cork by Isolated Bacteria and Fungi: A Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Gas Chromatography-Olfactometry Study.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(16): 7473-7479.

Índexs de qualitat de la publicació segons dades de SCI 2008

- **Índex d'impacte**: 2,562
- **Quartil i àrea** (s'indica la posició de la revista en el total de publicacions de l'àrea):
  1er (10/107) Food Science and Technology
  1er (8/61) Applied Chemistry

Prat, C., Ruiz-Rueda, O., Trias, R ., Anticó E., Capone, D., Sefton, M., Bañeras. L. 2009. Molecular fingerprinting techniques (PCR-DGGE) reveal significant differences of the microbial diversity of musty-earthy tainted corks.
Applied and Environmental Microbiology 75 (7): 1922-1931.

Índexs de qualitat de la publicació segons dades de SCI 2008

- **Índex d'impacte**: 3,801
- **Quartil i àrea**:
  1er (21/91) Microbiology,
  1er (25/144) Biotechnology and Applied Microbiology

Prat, C., Bañeras, L., Anticó, E. 2008. Screening of musty-earthy compounds from tainted cork using water-based soaks followed by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry.
European Food Research and Technology 227: 1085-1090

Índexs de qualitat de la publicació segons dades de SCI 2008

- **Índex d'impacte**: 1,622
- **Quartil i àrea**:
  2on (31/107) Food Science and Technology

ÍNDEX

1 Introducció 1

1.1 El tap de suro 3

1.1.1 Morfologia i composició química del suro 4

1.1.2 Procés d'elaboració del tap de suro natural 6

1.1.3 Procés d'elaboració del tap de suro aglomerat 9

1.1.4 Altres tipus de taps 11

1.2 Microorganismes associats al suro 12

1.3 Compostos orgànics volàtils presents en el suro 16

1.3.1 Gust de florit: principals compostos i organismes implicats 19

1.4 Mètodes analítics per determinar compostos volàtils en matrius sòlides 29

1.4.1 Microextracció en fase sòlida (SPME) 30

1.4.2 Determinació de compostos "aroma actius": les tècniques olfactomètriques .. 37

1.5 Mètodes moleculars per a la identificació de microorganismes 39

1.5.1 DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis) 43

1.6 Les tècniques d'anàlisi multivariant aplicades al camp de l'anàlisi de volàtils 45

1.7 Referències 47

2. Objectius 59

3. Publicacions 63

3.1 Screening of musty-earthy compounds from tainted cork using water-based soaks followed by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry 65

3.2 Molecular fingerprinting by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis reveals differences in the levels of microbial diversity for musty-earthy tainted cork 73

3.3 Off-odor compounds produced in cork by idolated bacteria and fungi: a gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-olfactometry study 85

3.4 Multivariate analysis of volatile compounds detected by headspace solid-phase microextraction: a tool for sensory classification of cork stoppers 95

4. Discussió.....121

4.1 Millores metodològiques en l'anàlisi per SPME 124

4.2 Microorganismes actius en el procés de bio-transformació i generació d'aromes desagradables 130

4.3 Agents biològics productors de defectes sensorials. Estudi olfactomètric amb organismes aïllats 134

4.4 Referències..... 140

5. Conclusions 143

Agraïments.....147

1. INTRODUCCIÓ

1.1 El tap de suro

El suro ja s'utilitzava a l'antic Egipte per tapar recipients però no va ser fins a finals del segle XVII en què el seu ús es popularitzà. El monjo benedictí francès, Dom Pierre Pérignon, va tenir la idea d'afegir sucre als vins joves de la Champagne per conservar l'efervescència que produïen de manera natural en el procés de fermentació. Per tal que aquesta empresa tingués èxit necessitava un sistema de tapament diferent dels taps de fusta o cànem impregnats d'oli que s'utilitzaven fins al moment. Per al tapament d'aquest nou producte, era necessari un material elàstic i impermeable que quedés ben ajustat al recipient i que impedís la pèrdua dels gasos produïts durant la fermentació. El suro va resultar ser el material que complia tots aquests requeriments específics. A partir d'aquí l'ús del tap de suro es va imposar per a tots els productes de la indústria vinícola degut a les seves característiques idònies per al tapament.

Es considera que el tapament és decisiu en l'evolució aromàtica del vi durant la maduració i emmagatzematge, i el suro hi contribueix positivament. Però l'aparició d'olors i gustos anòmals que es consideren cedits pel tap han fet aparèixer crítiques a l'ús del suro com a material pel tapament de vins. Preocupats per oferir sempre la màxima qualitat i seguretat en el producte, la Confederació Europea del Suro (CE-Liège), organisme que agrupa indústries i institucions del sector surer en sis països, va crear el 1996 un Codi Internacional de Bones Pràctiques Taperes (SYSTECODE). Es tracta d'un compendi de directrius que abasten tot el procés de fabricació del tap: des de l'arribada de la matèria primera fins a l'envasat i transport del producte acabat. L'acceptació d'aquestes directrius, de caràcter voluntari, ha estat important tal i com demostra el nombre creixent d'empreses adscrites cada any a aquest codi. Això dóna una idea del compromís del sector surer amb l'assegurament de la qualitat del producte.

El suro prové de l'escorça de l'alzina surera (*Quercus suber* L.), que és un arbre típic i exclusiu de la part occidental de la conca Mediterrània tant a Europa com al nord d'Àfrica. Es calcula que actualment les suredes ocupen en aquests territoris un total de

2.500.000 hectàrees, essent Portugal on ocupen una superfície més gran (dades de l'Instituto Corcho Madera y Carbón –www.iprocor.org-). Segons l'Associació Portuguesa del Suro (APCOR –www.apcor.pt-), la indústria europea del suro produeix 340.000 tones de suro cada any. La fabricació de taps per ampolles de vi i cava representa només el 15% de l'ús del suro en pes, però constitueix un 80% del negoci. Segons dades de l'Institut Català del Suro i AECORK (l'Associació dels Empresaris Surers de Catalunya), l'any 2007 es varen transformar a Catalunya 7.000 tones de suro, que es tradueix en una facturació de 224 milions d'euros. Catalunya produeix prop del 70% dels taps per a cava i vins espumosos del món, i el 10-15% del total de taps per a vins tranquils.

1.1.1 Morfologia i composició química del suro

El suro procedeix del fel·logen, un meristema secundari de l'alzina surera, que té una funció protectora i d'aïllament per a la planta i constitueix un producte forestal d'alta rendibilitat. Mentre que en la majoria de plantes llenyoses aquest teixit constitueix una capa molt prima de cèl·lules que se suberitzen i moren ràpidament, en l'alzina surera creix entre 1 i 10 mil·límetres a l'any i és capaç d'assolir un gruix suficient per a ser explotat comercialment (1) (Figura 1).

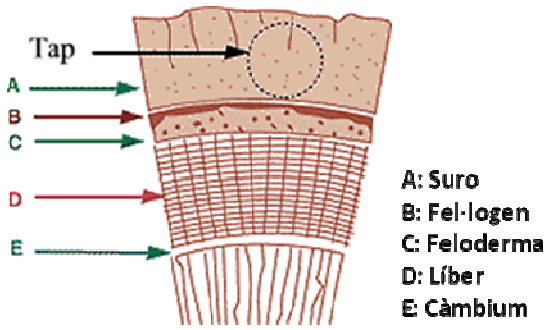

Figura 1. Esquema de la secció transversal dels teixits de l'alzina surera (http://www.preteux-bourgeois.com/esp/mise/pourq.htm)

El creixement d'aquest teixit varia segons l'edat de la mateixa escorça (temps transcorregut des de la darrera pela de l'arbre), l'edat de l'arbre que la genera, la seva

salut i les condicions ambientals del lloc on viu**.** Cada cicle de creixement anual queda separat del creixement de l'any anterior per una línia ben definida d'un color marró més fosc (Figura 2).

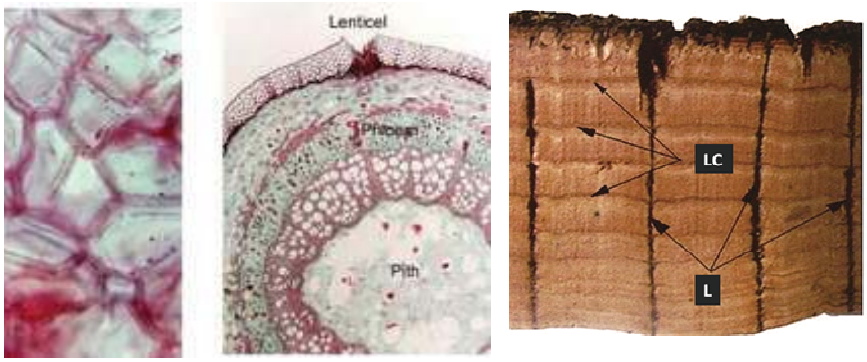

Figura 2. Esquerra- Imatge al microscopi òptic de la disposició de les cèl·lules vegetals en el súber. Centre- Imatge al microscopi òptic de la secció transversal d'una branca de suro on es mostra una lenticel·la (www.sbs.utexas.edu). Dreta- Fotografia d'una planxa de suro on es mostren les línies de creixement anual (LC) i les lenticel·les (L).

L'estructura del suro és similar a la d'un rusc. Un cm^3 d'escorça està format per uns 40 milions de cèl·lules de forma polièdrica, allargades i buides en el seu interior, que es disposen en capes compactes formant un teixit sense espais intercel·lulars (2). El teixit del suro presenta discontinuïtats degut a les lenticel·les, porus que travessen radialment el teixit suberós i que s'observen a simple vista fins i tot als taps un cop acabats (Figura 2). Aquestes lenticel·les són permeables als gasos, permetent l'intercanvi entre els teixits vius del tronc i l'exterior, però al mateix temps constitueixen canals que possibiliten l'entradade microorganismes (3).

La composició química del suro és difícil de concretar degut a la complexitat de la seva estructura polimèrica. No obstant això, l'anàlisi d'alguns dels seus components per separat ha estat objecte d'estudi per part de diversos autors que descriuen la següent composició aproximada: suberina (45%) -responsable de la resiliència del suro-, lignina (27%), polisacàrids (12%), tanins (6%), ceres (5%) i altres (1,4,5). L'alt contingut relatiu en components alifàtics, principalment àcids grassos de cadena llarga i els seus derivats (α,ω-

diàcids, ω-hidroxiàcids i alcohols), en la composició polimèrica del suro fan que sigui un material lipofílic altament impermeable. La naturalesa hidrofòbica del suro és d'especial rellevància en l'absorció de compostos volàtils no polars, com per exemple el 2,4,6-tricloroanisole, implicats en l'aparició d'olors desagradables.

Una altra propietat important del suro és la seva impermeabilitat als líquids, deguda a la presència de suberina, lignina i ceres en la seva composició. Tot i així la seva impermeabilitat no és absoluta, ja que permet la difusió lenta d'aigua i gasos. La permeabilitat de líquids a traves del teixit es dóna únicament per variacions en la humitat del suro, arribant-se a un valor de saturació en el contingut d'aigua que presenten les cèl·lules. Els gasos, en canvi poden difondre a través del suro malgrat que a velocitats molt petites, especialment quan la compressió del suro és elevada un cop utilitzat en el tapament (6, 7).

L'estructura de les cèl·lules del suro fa que el 90% del volum del teixit estigui ocupat per gas, de manera que la seva densitat és baixa, entre 0,12 i 0,25 kg/l. Aquest mateix fet fa que sigui un material elàstic i fàcilment compressible, propietats molt útils per al seu ús en el tapament en ampolla: el diàmetre del tap es redueix d'uns 24 a 18 mm en el moment de ser inserit a l'ampolla -fet que representa una reducció del 45 % del seu volum- per a recuperar el 85 % del seu volum inicial després de la seva compressió fins arribar al 94 % al cap de 24 h (8). Aquesta qualitat permet assegurar un tapament òptim durant llargs períodes de temps. Aquesta elevada elasticitat permet suportar les elevades pressions que produeixen els vins escumosos a l'interior de l'ampolla (3 bar).

1.1.2 Procés d'elaboració del tap de suro natural

El **tap de suro natural** (Figura 3a) s'elabora a través d'un procés tradicional, llarg i complex. Si bé el pas dels anys ha suposat la mecanització de moltes etapes, el procés global no ha experimentat grans canvis. Les principals etapes de fabricació són les següents:

1. Pela del suro: consisteix en separar l'escorça del tronc de l'arbre. Es fan dos talls circulars al voltant de l'alzina i un o dos talls verticals; i colpejant amb el mànec d'una destral es facilita el despreniment de l'escorça. La primera lleva es produeix quan l'arbre ja té uns 30 anys de vida. El suro obtingut en aquesta lleva i també en la segona no és adequat per fer taps de suro i es destina a l'elaboració d'articles decoratius i boies. A partir de la tercera pela el suro ja es pot usar en la fabricació de taps i a partir de la desena lleva la seva qualitat disminueix. L'escorça augmenta el seu diàmetre en uns 3 mm l'any, de manera que la lleva es pot dur a terme cada 9-10 anys.

2. Rentat, emmagatzematge i tria: les planxes sotmeses a una primera bullida s'apilen corbades a l'aire lliure durant un període de 3 a 12 mesos. Durant aquest temps es produeix l'eliminació de part de la humitat i dels possibles residus de saba i tanins. Passat aquest temps es fa una tria visual, s'eliminen les planxes que presentin defectes (taca groga, corcs) i les que estiguin en contacte amb el terra. De la quantitat de suro extreta de l'arbre se n'aprofita un 60 % per a l'elaboració de taps, mentre que la resta es destina a la fabricació de granulat amb finalitats aïllants o decoratives.

3. Bullida: un cop les planxes arriben a la fàbrica se'ls aplica una segona bullida a 100 ºC durant aproximadament una hora. Els objectius principals d'aquest tractament són l'eliminació de totes les restes de terra i brutícia que puguin haver quedat al suro, així com d'alguns compostos presents en aquest (fenols, tanins...); s'aconsegueix també donar flexibilitat al suro perquè pugui ser manipulat en els processos posteriors. Teòricament, el tractament tèrmic elimina també la majoria dels microorganismes, tot i que hi ha estudis que demostren que la temperatura que s'assoleix a l'interior del suro pot ser inferior a 85ºC i per tant aquest tractament pot no ser del tot efectiu com a sistema d'esterilització (9).

4. Maduració o estabilització: les planxes de suro apilades perden la seva curvatura. Es deixen assecar durant unes 3 setmanes fins assolir un grau d'humitat entre el 15 i el 18

%. En aquesta fase el suro pot quedar recobert per microorganismes, bàsicament fongs, que podrien afectar la seva qualitat final.

5. Llescat i perforat: un cop eliminades les parts inferiors i superiors de les planxes (ventre i esquena), aquestes es tallen en tires (llescat) i es perforen amb un cilindre buit que té el mateix diàmetre que el tap. Els taps resultants s'esmerilen per a donar-los a tots la mateixa llargada i polir-ne les superfícies.

6. Tria: els taps se seleccionen segons la seva qualitat, que ve determinada per la seva porositat -a menys densitat de porus més qualitat- i per la presència de taques i d'imperfeccions.

7. Rentat: el rentat té com a objectiu desinfectar el tap i al mateix temps blanquejar-lo per donar-li un aspecte més clar i uniforme, tot i eliminant les parts més llenyoses del suro que tenen una coloració més fosca. Els productes més utilitzats en el rentat són l'àcid peracètic i el peròxid d'hidrogen. L'ús d'hipoclorit s'ha abandonat darrerament ja que pot afavorir la transformació de fenols en clorofenols. Un cop dut a terme el rentat caldrà verificar que no quedin residus de peròxid en els taps que puguin afectar el vi. Després pot aplicar-se un igualador per donar color als taps abans d'assecar-los fins que assoleixin una humitat del 6-8 %. La baixa humitat evita la proliferació de microorganismes.

8. Marcatge: es graven la signatura o l'emblema del client i, en ocasions, les inicials de l'empresa surera. Pot fer-se a tinta o amb foc però, en el cas dels caps, el marcatge es porta a terme sempre amb foc per tal que la tinta no entri en contacte amb el vi.

9. Tractaments superficials: s'apliquen parafines o silicones amb la finalitat de facilitar el procés d'embotellament i d'extracció del tap i millorar la seva impermeabilitat.

10. Embalatge: els taps es preparen per al seu transport als cellers en bosses de plàstic sota atmosfera de SO_2, amb la finalitat de mantenir unes condicions que evitin el creixement de microorganismes.

El **tap reblert** (Figura 3b) és una opció per aprofitar taps de baixa qualitat (que tenen una porositat elevada). A aquests taps se'ls aplica un procés de rebliment que consisteix en omplir els forats amb pols de suro -produïda com a residu en els processos de tall- utilitzant un aglutinant. Amb aquest procés es millora tant el seu aspecte extern com l'estanquitat que proporcionen al tapament.

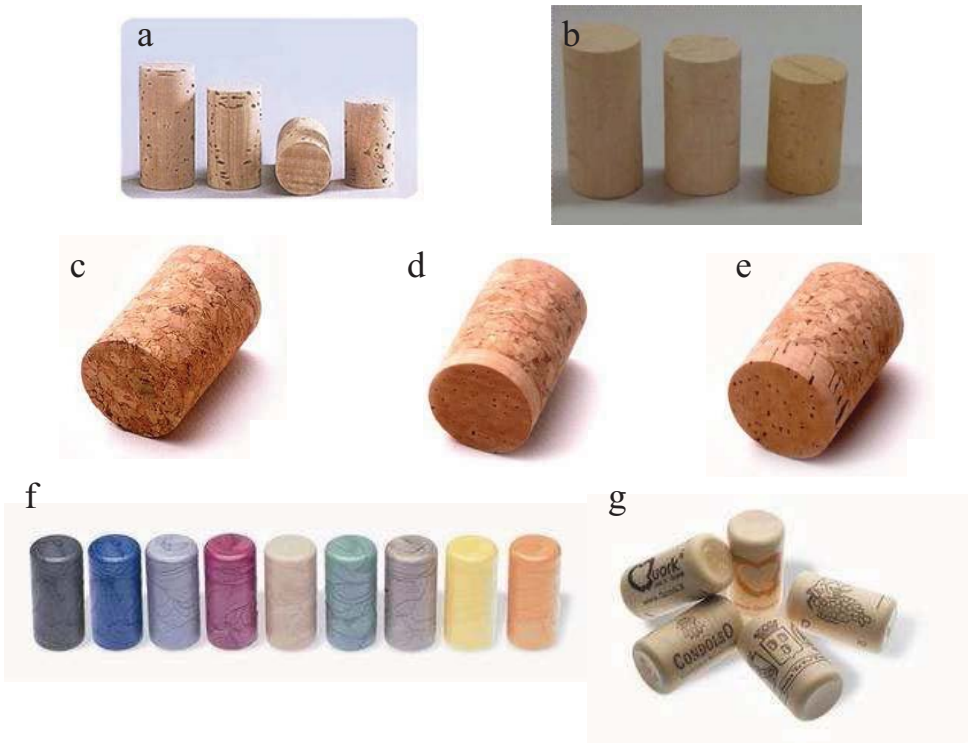

Figura 3. Imatges de diferents tipus de taps: a) tap de suro natural, b) tap reblert, c) tap aglomerat, d) tap 1+1, e) tap de cava, f i g) taps sintètics

1.1.3 Procés d'elaboració del tap aglomerat

Un altre tipus de taps són els **taps aglomerats** (Figura 3c) formats per la unió de suro triturat utilitzant resines alimentàries, com coles de caseïna o poliuretà. El procés de fabricació d'aquests taps comparteix vàries etapes amb la fabricació del taps naturals:

pela del suro, rentat, emmagatzematge i tria, bullida, i maduració. Per a la fabricació de taps aglomerats s'aprofiten retalls de suro sobrant en l'elaboració de taps naturals -peces petites de planxa, làmines massa primes per perforar taps, llesques un cop perforades, trossos resultants del rectificat de taps, taps i discs naturals rebutjats a la tria-.

1. Triturat: Aquests trossos es passen a un molí on es trituren. El granulat resultant es garbella i se separa segons el seu diàmetre. Per a l'elaboració de taps s'utilitzen grànuls de 3 a 7 mm de diàmetre barrejats en diferents proporcions. Els més grans es tornen al molí per ser triturats de nou i els que no arriben a aquest diàmetre es destinen a la fabricació de granulat per altres usos (aïllant, decoratiu...)

2. Extrusió o motlle dels taps: Per donar forma als taps s'utilitzen dues tècniques: l'extrusió o el motlle. Per a l'extrusió es barreja el suro i la cola en un dipòsit i mitjançant un procés d'extrusió s'obtenen unes barres que es tallen a la longitud desitjada. En aquest procés els taps s'estan al forn un període breu de temps. Si s'utilitza l'amotlladora cada tap es prepara individualment. La barreja de granulat i cola s'introdueix en uns motlles i passen vàries hores al forn. Els taps fabricats amb motlle són de més qualitat que els que s'obtenen per extrusió.

Una variant dels taps aglomerats són els taps resultants de unir dos discs de suro natural de bona qualitat a un tap aglomerat. Els discs poden anar un a cada extrem del tap (**1+1**, Figura 3d) o tots dos a la part inferior. Aquests últims són els que s'utilitzen habitualment com a **taps de cava** (Figura 3e), ja que els discs en ser un element més compacte ajuden a la contenció de la pressió del gas. La seva fabricació parteix dels taps aglomerats i continua amb les següents etapes:

3. Llescat i perforat dels discs: Les planxes es tallen a llesques primes i es perforen perpendicularment al ventre i esquena –a diferència del perforat per obtenir taps que es fa paral·lelament-.

4. Tria: mitjançant un procés automatitzat se separen els discs segons la seva qualitat i per cada un d'ells es tria i es marca la cara amb més imperfeccions que serà la que anirà a la part interior.

5. Encolat: s'utilitzen les mateixes coles que per a l'extrusió o l'amotllat. Els taps passen uns minuts al forn i després varis dies en una cambra d'estabilització a uns 25-30 ºC. Passat aquest temps els taps s'esmerilen per donar el mateix diàmetre als discs que al tap i si el client ho desitja es bisellen.

6. Tria: Es realitza una nova tria dels taps, descartant aquells en què els discs han quedat descentrats o taps que s'han esmerilat o bisellat irregularment.

A partir d'aquí es realitza el marcat i el tractament de superfície de la mateixa manera que en els taps naturals.

En general, els taps aglomerats tenen una densitat superior que la d'un tap de suro natural, i especialment els que no presenten discs al seus extrems tenen menys capacitat d'expansió quan es comprimeixen a l'interior del coll de l'ampolla i això fa que siguin el tipus de taps que provoca una major oxidació del vi. Un altre inconvenient és que aquest tipus de taps tenen més tendència a esmicolar-se quan són extrets de l'ampolla. Per altra banda, les coles i aglutinants utilitzats en taps reblerts i aglomerats poden alliberar, en alguns casos, substàncies que provoquen defectes en el vi. Els defectes provocats per substàncies d'aquest tipus no es poden atribuir al suro ja que són perfectament diferenciables del característic "gust de florit". Aquests taps són considerats de menor qualitat que els taps naturals.

1.1.4 Altres tipus de taps

En els últims anys han aparegut els **taps tècnics**, que són el resultat de la unió de suro (generalment en forma de granulat fi) amb materials sintètics. Els taps fabricats amb

aquests materials tenen unes propietats molt semblants al suro però millorant alguns aspectes com l'elasticitat o l'estanquitat.

Deixant de banda el suro podem trobar els **taps sintètics** (Figura 3 f/g), formats generalment de poliolefines. Els principals avantatges són que no presenten el problema de creixement de microorganismes ja que no tenen un origen biològic, tenen una mida més uniforme que facilita el tancament i solen tenir un cost menor que els taps de suro de qualitat. Però no tot són avantatges, la seva capacitat elevada d'adsorció de substàncies volàtils odoríferes fa que puguin transferir-les després cap al vi alterant la seva aroma. Un altre inconvenient és que la imatge que en tenen els consumidors fa que no l'acceptin fàcilment en vins de gamma alta.

En últim lloc també podem trobar **taps metàl·lics de rosca**, que si bé presenten el mateix problema de reticències en els consumidors que els taps sintètics, hi ha estudis que demostren que el tapament és tan efectiu com el dels taps de suro, amb l'afegit que té més fàcil obertura i no són tan susceptibles a la contaminació amb microorganismes.

1.2 Microorganismes associats al suro

En el suro s'hi pot trobar una gran diversitat de microorganismes, principalment bacteris, fongs i llevats. La seva procedència pot ser atmosfèrica, del sòl o de la mateixa alzina surera. Estudis utilitzant el microscopi electrònic documenten la presència de fins a 10^8 unitats formadores de colònies (ufc) de fongs, 10^4 ufc de llevats i 10^4 ufc de bacteris per tap (10). Altres estudis demostren una distribució més equitativa de fongs i bacteris, $6{,}2 \times 10^6$ ufc/g i $7{,}12 \times 10^5$ ufc/g, respectivament en mostres preses en el trau després de la bullida del suro (Figura 4) (11). En qualsevol cas, l'abundància de microorganismes és molt variable al llarg de les etapes de producció dels taps i d'una mostra a una altra.

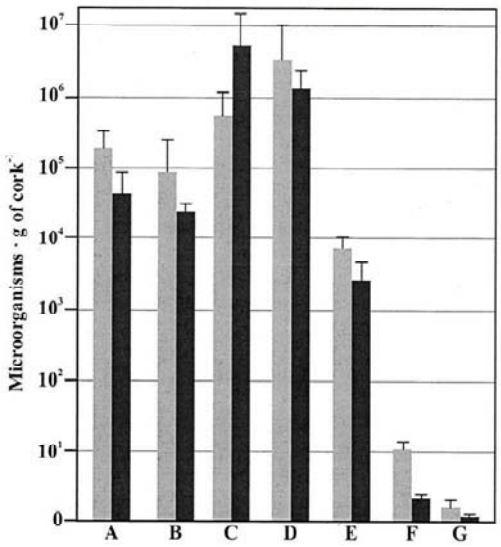

Figura. 4. Evolució de la concentració de bacteris (gris) i de fongs (negre) durant la fabricació de taps de suro aglomerat. Les mostres corresponen a diverses etapes de la fabricació: suro cru (A), suro bullit (B), trau (C), planxes durant l'estabilització (D), suro granulat (E), tap de suro aglomerat enganxat (F), i tap de suro final (tractat amb SO_2) (G). Els resultats són el promig de quatre anàlisis independents. Gràfica de Álvarez *et al.* (11)

El procés d'elaboració del suro consta d'un gran nombre d'etapes, com s'ha vist abans, fet que determina una elevada complexitat en els processos que configuraran la comunitat microbiana en cada fase. És durant les etapes d'estabilització i repòs, generalment de llarga durada i amb unes condicions ambientals estables, en què s'afavoreix el creixement i evolució de microorganismes. Per contra, hi ha etapes on es pot produir un canvi substancial de la comunitat microbiana degut a modificacions exteriors sobtades, per exemple la calor durant la bullida, el tractament amb SO_2 en l'embalatge o la utilització de coles aglomerants (Figura 5).

La majoria dels estudis publicats se centren en l'estudi de la diversitat de fongs a les planxes durant l'estabilització, després del procés de bullida, probablement, perquè el creixement de fongs en aquesta fase fa que siguin les espècies visualment predominants. En aquest estadi el nivell d'humitat a les planxes és alt i el tractament tèrmic augmenta la disponibilitat dels nutrients. Tot i així poden trobar-se gran quantitat de microorganismes en etapes posteriors degut a la resistència d'algunes espècies a les temperatures que

s'assoleixen en el suro durant la bullida i a la ineficaç transmissió de calor dins les planxes de suro degut a les seves propietats aïllants i d'impermeabilitat (9, 12).

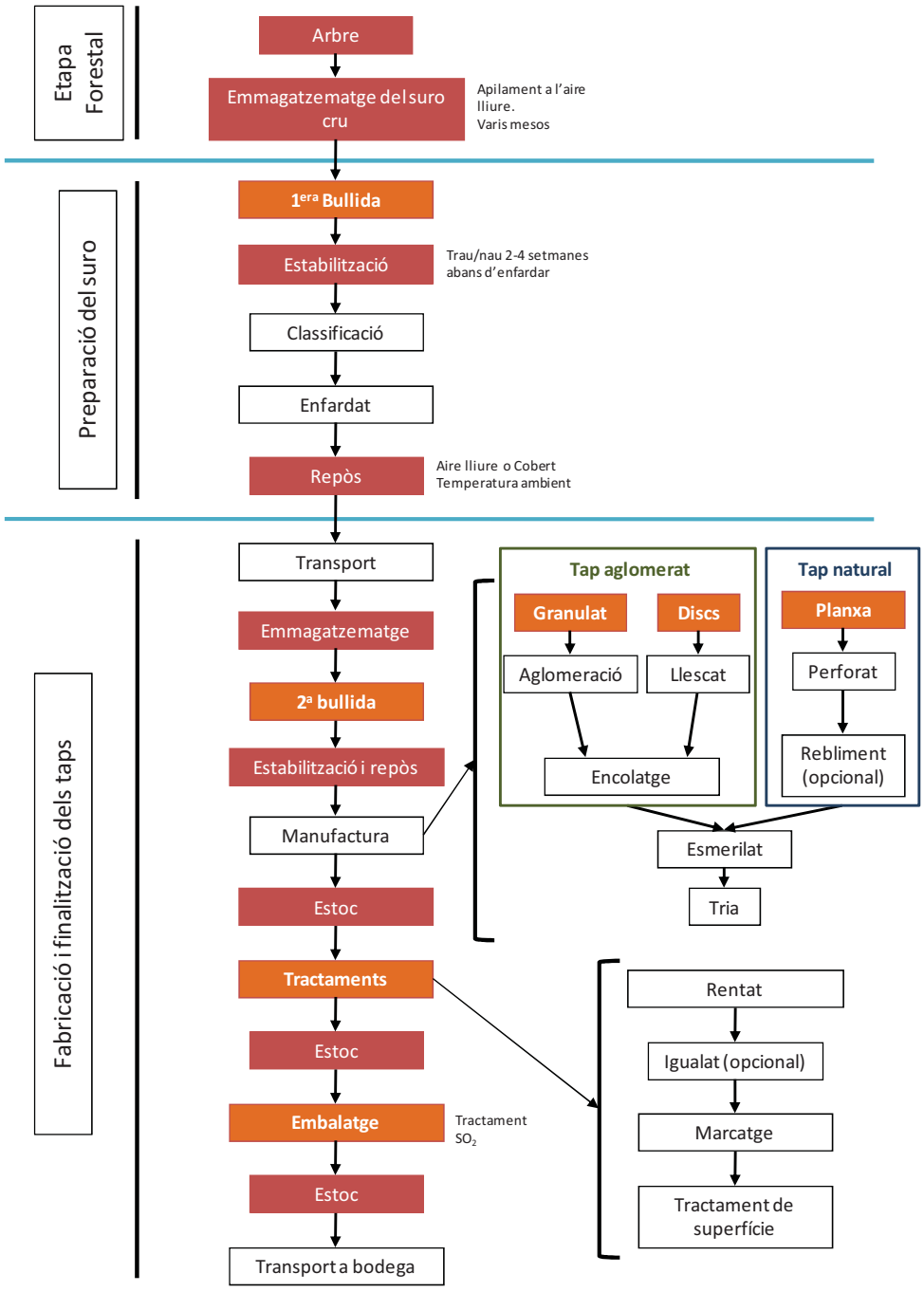

Figura 5. Esquema del procés d'elaboració del tap de suro on s'assenyalen els punts de risc pel que fa al creixement i activitat dels microorganismes presents (vermell) i els punts en els que es suposa un canvi dràstic en l'estructura de la comunitat microbiana (taronja).

Els gèneres de fongs més comunament detectats en suro són *Acremonium, Aspergillus, Chrysonilia, Cladosporium, Fusarium, Mucor, Paecylomices, Penicillium* i *Trichoderma* (11-19). També s'han detectat altres gèneres com *Alternaria* (14)*, Mortierella o Verticillium* (11) (Taula 1).

Taula 1. Relació dels gèneres predominants de fongs filamentosos, bacteris i llevats aïllats durant el procés de manufactura dels taps.

FONGS FILAMENTOSOS	BACTERIS	LLEVATS
Acremonium *Alternaria* *Aphanocladium* *Aspergillus* *Armillaria* *Chrysonilia* *Cladosporium* *Fusarium* *Mortierella* *Mucor* *Neurospora* *Paecilomyces* *Penicillium* *Trichoderma* *Verticillium*	*Bacillus* *Pseudomonas* *Streptomyces*	*Aureobasidium* *Candida* *Cryptococcus* *Debaryomyces* *Pichia* *Rhodosporidium* *Rhodotorula* *Sporobolomyces* *Sporodiobolus* *Trichosporon*

L'espècie dominant en l'etapa d'estabilització és *Chrysonilia sitophila*, fong del qual s'ha suggerit que pot actuar com a inhibidor del creixement d'altres fongs (19). Aquesta espècie es troba en les primeres etapes del procés, després la seva abundància disminueix i no és habitual trobar-lo després del perforat (17). En aquestes fases poden aparèixer com a majoritàries altres espècies com *Penicillium* spp. La identificació de les

soques de *Penicillium* mitjançant la comparació de seqüències d'ADN ha revelat la presència d'un elevat nombre d'espècies inusuals, inclosos alguns grups filogenètics específics no descrits anteriorment en suro (12).

Els gèneres *Trichoderma i Penicillium* es relacionen habitualment amb suro amb taca groga, però son abundants també en mostres de suro sense defectes visuals (20). Les espècies *Trichoderma longibrachiatum, Cladosporium oxysporum i Penicillium* spp. s'han aïllat en totes les fases del procés de producció incloent-hi els taps acabats, mentre que d'altres gèneres com *Mortierella* i *Mucor*, només s'han detectat en suro cru. Una de les possibilitats que permet explicar aquest fet és la diferent resistència de les espècies detectades als tractaments tèrmics (11).

Els llevats més comunament aïllats del suro són dels gèneres *Candida, Cryptococcus, Rhodorotula, Rhodosporium, Sporodiobolus i Sporobolomyces* (13, 16, 21, 22). Altres llevats aïllats del suro són *Aureobasidium*, *Debaryomyces* (13) i *Pichia* (22). S'han aïllat llevats a totes les etapes del procés de fabricació (9) tot i que segons alguns autors s'aïllen principalment en les etapes que tenen lloc a l'aire lliure i ja no es detecten a les fases que tenen lloc a l'interior de la indústria (16).

Tot i que la majoria d'estudis coincideixen en considerar com a més abundant la població de fongs (23), hi ha autors que han aïllat majoritàriament espècies de bacteris durant les etapes inicials abans de la maduració i en el posterior procés de manufactura del suro. En aquest cas, les espècies més abundants pertanyen a gèneres de bacteris que desenvolupen estructures de resistència al calor com ara *Bacillus* i *Streptomyces* (13).

1.3 Compostos orgànics volàtils presents en el suro

En ser un producte natural, el suro presenta una gran complexitat química. A més dels components majoritaris anomenats en l'apartat 1.1.1, hi ha presents un gran nombre de compostos minoritaris, molts d'ells volàtils, que es formen en les diferents rutes

metabòliques, com la de l'àcid shiquímic, a partir de proteïnes i aminoàcids, oxidació de lípids o la hidròlisi de polisacàrids. D'entre aquests compostos podem destacar el grup dels **terpens i terpenoides**: és un grup ampli que engloba compostos amb diferents funcionalitats (alcohols, hidrocarburs, aldehids..) i que es troben presents en moltes famílies de plantes. Els terpens són els principals constituents dels olis essencials, que són usats com a additius en el menjar, com a fragàncies en perfumeria, en aromateràpia i en medicina tradicional i alternativa. Alguns terpens detectats en suro es representen a la figura 6 (24, 25)

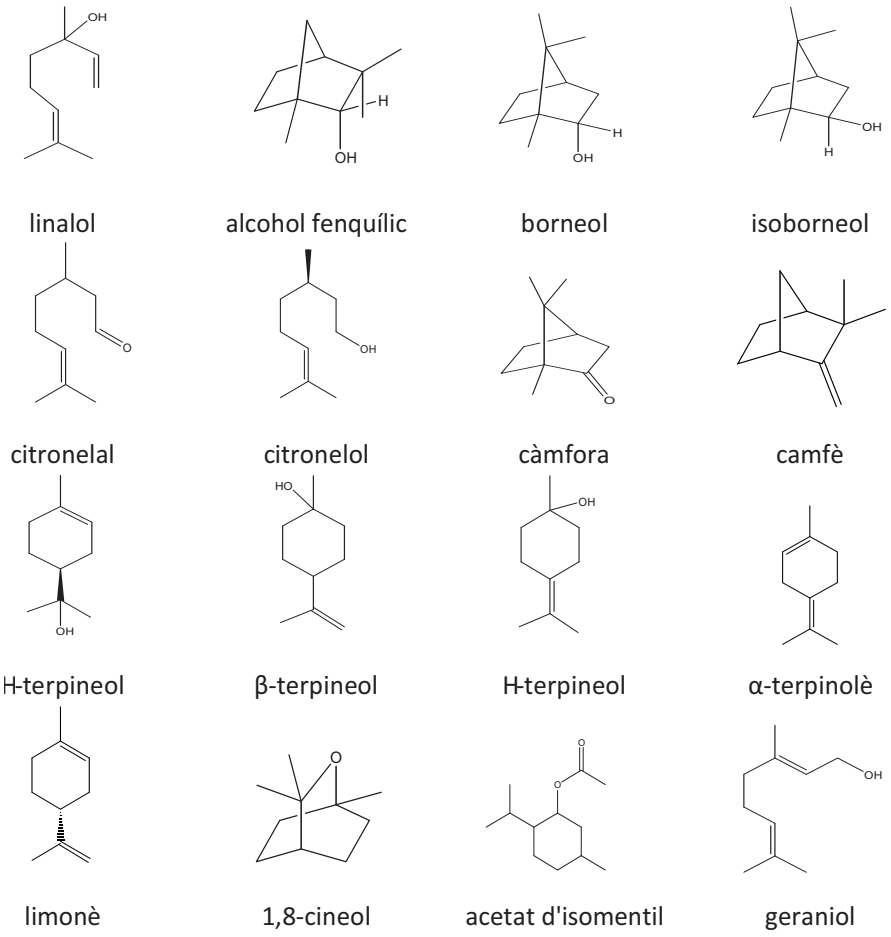

Figura 6. Estructures dels terpenoides majoritaris detectats en suro

Altres famílies de compostos volàtils són els **alcohols** i els **compostos carbonílics alifàtics.** Alguns d'aquests compostos són actius olfactòriament, per exemple 1-octen-3-

ol, 1-octen-3-ona, octanol, octanal i el 2-nonenal (Figura 7). Generalment els compostos carbonílics presenten llindars de percepció més baixos que els dels seus corresponents alcohols.

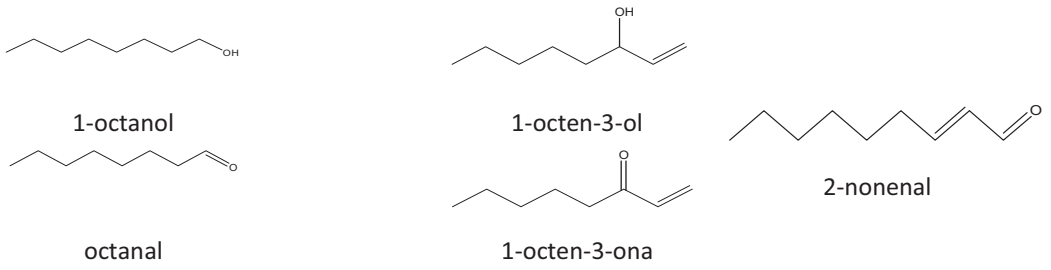

Figura 7. Estructura d'alguns dels principals alcohols i aldehids alifàtics presents en el suro

Degut a la seva naturalesa com a component llenyós de la planta, en el suro s'hi troben també compostos volàtils **derivats de la lignina**, per exemple guaiacol, 1,2-dimetoxibenzè (veratrol) i alcohol benzílic (Figura 8).

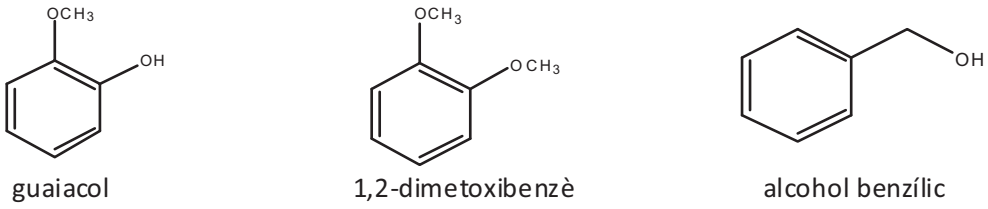

Figura 8. Estructura d'alguns compostos derivats de la lignina presents en el suro

Les concentracions en què aquests compostos es poden trobar al suro són molt variables i també els seus llindars de percepció, això fa que l'estudi de la fracció volàtil del suro sigui una tasca gens senzilla i no massa estudiada. El següent apartat se centra en un conjunt de compostos volàtils d'especial rellevància en la qualitat del suro per la seva participació en l'aparició de defectes sensorials.

1.3.1 Gust de florit: principals compostos i organismes implicats

Entre els diferents defectes organòleptics que s'han associat al vi, el que ha generat més interès és el "gust de suro". Amb aquest nom s'engloba l'efecte de diversos contaminants volàtils, que influeixen negativament en les propietats sensorials del vi i que de manera més ajustada s'hauria de descriure com a olor d'humitat, de florit o de ranci.

Cal tenir en compte, però, que l'ús indiscriminat de la denominació "gust de suro" n'atribueix la responsabilitat al suro quan molts cops la contaminació prové d'altres fonts. El veritable gust de suro és un defecte molt poc freqüent i s'associa al creixement d'*Armillaria mellea* o taca groga, que pot aparèixer al peu de les alzines sureres, especialment en ambients humits (23). Aquest defecte és fàcilment identificable, té una olor pútrida característica, i el suro que n'està afectat es rebutja per a l'elaboració de taps.

Independentment de la seva procedència o origen, la incidència dels aromes que definim com a florit-humitat és un dels problemes més importants als quals s'enfronta la indústria vinícola, ja que, a part de provocar importants pèrdues econòmiques, perjudica seriosament la reputació dels cellers que el pateixen. Alguns estudis estimen que entre un 1 i un 5 % de les ampolles que es posen al mercat presenten aquesta alteració (26). El tap de suro ha estat tradicionalment el principal encausat en l'aparició d'aquests tipus de defectes. No obstant això, quan s'analitzen vins sospitosos de ser afectats s'observa que alguns dels compostos que s'associen al "gust de florit" es troben en vins contaminats sense que la causa del contagi hagi estat el tap. Per exemple s'ha determinat la presència de 1-octen-3-ona en extractes de raïm afectat per oídium –malaltia causada per un fong ascomicet que ataca les fulles, les flors i els grans- (27). També el raïm s'ha proposat com la causa de la contaminació del vi per geosmina (28). En ocasions el vi pot ser contaminat abans de l'embotellament com a resultat del contacte amb utensilis o bótes contaminats o per la seva manipulació en cellers amb contaminació ambiental. Així, per exemple s'ha detectat 3-isopropil-2-metoxipirazina (IPMP) degut al contacte amb una bóta florida (29).

En la majoria dels casos descrits anteriorment, però, la contaminació és detectada pel productor i el vi no arriba al consumidor. Quan la contaminació arriba al producte final, la variació del nivell de contaminació entre ampolla i ampolla se sol considerar una evidència de que el tap és el responsable de la contaminació. En canvi, si la contaminació es produeix abans de l'embotellament s'espera un nivell de defecte uniforme a totes les ampolles.

Existeixen varis compostos que comunament s'associen amb el defecte florit-humitat, tot i que no existeix un descriptor aromàtic comú per a tots ells (Taula 2). Els llindars de percepció d'aquests compostos varien segons la matriu (aigua o vi) i segons l'experiència dels tastadors.

Taula 2. Descriptors sensorials i llindars de percepció en aigua i en vi pels compostos relacionats amb el gust de florit. (23, 27, 28, 30-34)

Compost	Descriptor	Llindar de percepció ng L^{-1}	
		en aigua	en vi
Geosmina (GSM)	Terrós, florit, humit	10	60-65
Guaiacol (GUA)	Fumat, fenòlic, medicinal	-	20.000
2-metilisoborneol (MIB)	Terrós,	20	30
2-metoxi-3,5-dimetilpirazina (MDMP)	Fong	0,4	2
2-metoxi-3-isobutilpirazina (IBMP)	Pebrots verds	0,5-2	10-16
2-metoxi-3-isopropilpirazina (IPMP)	Terrós, vegetal	1-2	2
1-octen-3-ol	Bolet, metàl·lic	7.000	20.000
1-octen-3-ona	Bolet, metàl·lic	7	20
Pentacloroanisole (PCA)	Humit, florit, ranci	-	-
2,3,4,6-tetracloroanisole (TeCA)	Humit, florit, ranci	4	25
2,4,6-tribromoanisole (TBA)	Humit, ranci	-	4
2,4,6-tricloroanisole (TCA)	Florit, humit	<1	3-10
2,4,6-triclorofenol (TCP)	químic	2	-

Aquests compostos han estat objecte de nombrosos estudis per avaluar la seva influència en la contaminació del vi en contacte amb el tap. S'ha vist abans que el suro natural té una gran diversitat de microorganismes. D'aquests, un gran nombre d'espècies són capaces de degradar constituents del suro o contaminants ambientals produint

metabòlits volàtils. Entre aquests metabòlits es poden trobar alguns dels compostos de la Taula 2, que són els que presenten un major interès en l'estudi de defectes sensorials. Així doncs, a causa de la relació que s'estableix entre microorganismes i compostos volàtils, s'imposa el control microbiològic en les indústries de producció de taps i en els cellers per tal d'assegurar la qualitat del producte.

Cloroanisoles

El TCA (2,4,6-tricloroanisole) va ser el primer compost en ser identificat com a causant del "gust de florit" i ara està considerat com al principal responsable d'aquest defecte. S'estima que entre un 80 i un 85 % dels casos de gust de florit són atribuïbles a aquest compost (29).

El TCA és un compost volàtil, no tòxic en les concentracions presents al vi, amb una olor intensa de florit o d'humitat. El seu límit de percepció en matriu aquosa és molt baix i se situa entre 0,03 i 4 ng/l segons els autors, però cal una concentració més gran (3-10 ng/l) perquè es detecti la contaminació en vins (23, 35, 36).

La síntesi i acumulació de diferents haloanisoles (cloro- i bromoanisoles són els més freqüents en vi) a partir de la biometilació dels seus corresponents halofenols per part de fongs i bacteris és un procés ben documentat. Els cloroanisoles són productes derivats dels seus corresponents clorofenols (Figura 9) a través d'una O-metilació: substitució de l'hidrogen del grup hidroxil, per un grup metil. Aquesta transformació ha estat descrita per molts autors com a un mecanisme de destoxicació habitual en el medi ambient com a alternativa a la biodegradació dels clorofenols, elements altament tòxics (37-39). El procés s'ha demostrat experimentalment utilitzant com a substrat suro fortificat amb 2,4,6-triclorofenol. (9, 18, 38-40). La reacció de metilació catalitzada s'ha confirmat utilitzant una clorofenol O-metiltransferasa purificada de *Trichoderma longibrachiatum* aïllat de mostres de suro (11, 41). Aquest enzim és específic per a fenols halogenats que contenen fluor, clor o brom com a substituents. La O-metiltransferasa és un enzim termolàbil, la seva activitat màxima es dóna a 28ºC i a un rang de pH de 8,2-8,5.

Una característica interessant és que és induïble, només és produïda com a resposta a la presència de clorofenols, especialment pels que tenen de 3 a 5 àtoms de clor.

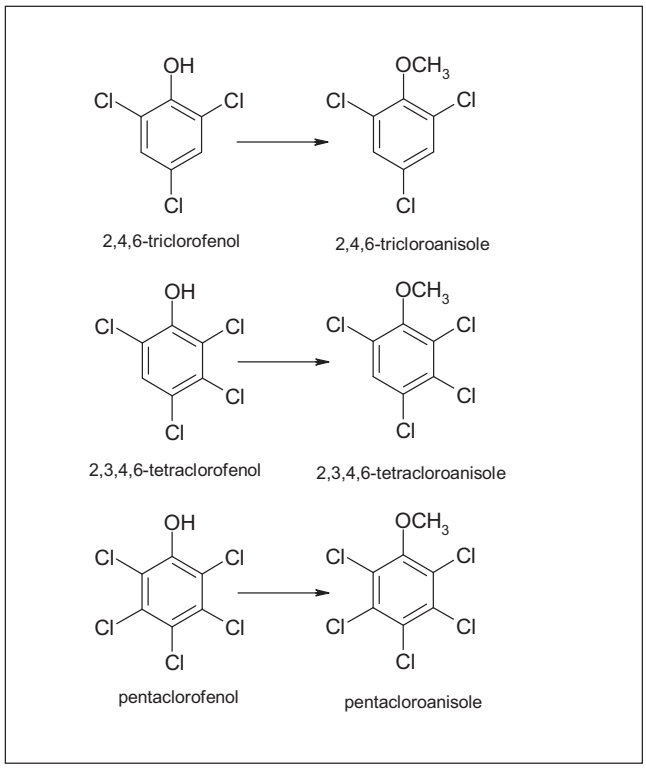

Figura 9. Estructures dels principals cloroanisoles i els seus precursors fenòlics.

Els gèneres *Penicillium* i *Trichoderma* es relacionen segons molts autors amb la formació de cloroanisoles, destacant que la capacitat de degradació de TCP de *Penicillium* no és tan gran com la de *Chrysonilia* però la seva eficiència de transformació en TCA és més elevada (19). Nombrosos autors han estudiat espècies de *Penicillium* aïllades del suro per determinar la seva responsabilitat en la producció de defectes sensorials. Álvarez-Rodriguez *et al.* han aïllat i identificat *P. chrysogenum, P. citreonigrum* i *P. purpurogenum* com a espècies capaces de produir TCA quan se'ls subministra TCP, amb un nivell de bioconversió del 8, l'11 i el 13% respectivament (11). Aquestes espècies també són capaces de produir TCA sense l'aportació de TCP tot i que en menys quantitat. En qualsevol cas, s'accepta que la formació de TCA és depenent de la prèvia presència de TCP com a contaminant en suro. En els estudis de Prak *et al.* es determina que *P. glabrum* és capaç de convertir TCP a TCA amb un rendiment del 20%, quan creix en cultius líquids enriquits amb TCP, però aquest rendiment baixa a un 6% quan al medi no se li afegeix TCP

i a un 2% quan aquest microorganisme creix sobre granulat de suro impregnat de medi líquid (18).

A la bibliografia es poden trobar descrits molts altres fongs capaços de transformar TCP en TCA: *Acremonium* sp.*, Cladosporium* sp.*, Paecilomyces* sp.*, Verticillium* sp., *Fusarium* sp.. Aquest últim pot assolir nivells alts de bioconversió, semblants a *Penicillium* i *Trichoderma* (11).

Els clorofenols es poden trobar en suro o en vi de resultes de la seva aplicació com a herbicides, fungicides i insecticides a l'escorça dels arbres usats per elaborar els taps o com a tractament de la fusta de les bótes en cellers, precisament per la seva capacitat biocida. Actualment la utilització de PCP està restringida per la directiva europea 91/173 però el seu baix cost fa que encara estigui en ús en alguns països. Per altra banda el suro conté de forma natural fenols i productes de degradació de la lignina que, en contacte amb alguns productes de rentat clorats, es poden transformar en clorofenols (36) (Figura 10). Per evitar aquest risc s'ha anat abandonant el rentat tradicional amb hipoclorit en les indústries transformadores del suro.

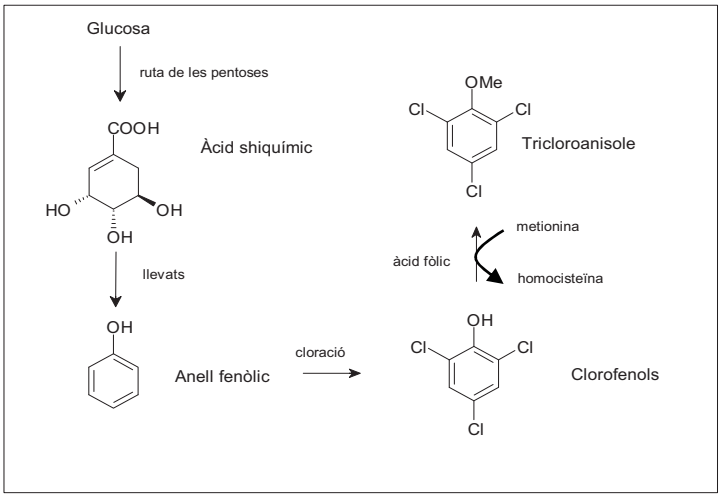

Figura 10. Esquema proposat per a explicar la formació del TCA a partir de precursors metabòlics comuns com la glucosa o derivats.

Els clorofenols, per tant, no es poden considerar causants del gust de florit sinó precursors, ja que, si bé és possible la seva presència en vins, la seva aroma es descriu com a química i no com a olor de florit o humit. L'anàlisi dels cloroanisoles i clorofenols s'està implantant en la indústria surera per evitar els problemes que pot desencadenar la seva transformació i certificar la qualitat del producte.

Recentment s'està incloent a l'estudi d'aquests compostos el dels seus anàlegs bromats, tribromoanisole (TBA) i tribromofenol (TBP). El TBA s'ha identificat com responsable del gust de florit en el vi (33), i el seu efecte pot ser important quan altres compostos com el TCA i el TeCA es troben per sota del llindar de percepció. Tal i com s'ha comentat anteriorment, el seu origen és microbià, a partir de la metilació del seu precursor fenòlic, TBP. En general, la presència de TBA en vins és rarament atribuïble al tap, ja que el TBP es pot trobar com a contaminant en cellers degut al seu ús en antifúngics i retardants de flama. No obstant això, cal remarcar que si bé els taps usats poden estar lliures de TBP, els fongs presents en aquest podrien catalitzar la conversió de TBP del celler a TBA en les condicions adequades.

Guaiacol (2-metoxifenol)

El guaiacol va ser identificat com a principal metabòlit d'un bacteri del sòl (*Streptomyces)* (21). Aquest compost es troba relacionat amb suro que presenta el defecte de la taca groga. També pot ser sintetitzat per bacteris dels gèneres *Bacillus, Pseudomonas, Streptomyces* i el llevat *Rhodotorula* a partir de la lignina o la vainillina (13, 42), per tant la contaminació d'un vi per guaiacol, no pot ser atribuïda només al tap de suro sinó que pot ser deguda també a la degradació de la lignina provinent de la fusta de la bóta (Figura 11).

El guaiacol s'ha detectat en vins afectats per defectes sensorials, però té un nivell de percepció tan alt (Taula 2) que difícilment es troben concentracions majors del llindar al vi, i per tant no apareix mai com a únic causant d'alteracions sensorials. Malgrat això, la seva presència en un vi a concentracions baixes resulta un element a tenir en compte, ja

que diversos autors han documentat que el guaiacol pot contribuir a la potenciació (sinergia) dels efectes d'altres compostos amb aromes semblants com el TCA (36, 43).

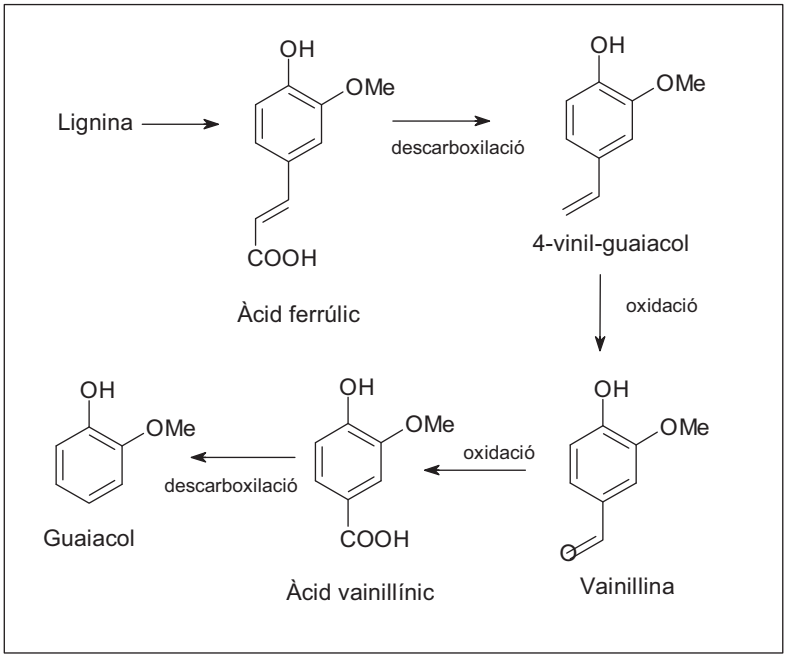

Figura 11. Ruta sintètica del guaiacol a partir de la degradació de la lignina

1-octen-3-ol i 1-octen-3-ona

Aquests compostos amb un nombre de carbonis igual a vuit s'han descrit com a metabòlits de fongs. Aïllats del gènere *Penicillium*, juntament amb *Aspergillus* també són responsables de la formació d'altres compostos a banda del TCA, com l'1-octen-3-ol i la seva cetona, 1-octen-3-ona (44, 45). La seva ruta biosintètica s'inicia en els lípids (Figura 12).

L'1-octen-3-ol s'ha descrit com a auto-inhibidor de la germinació en fongs del gènere *Penicillium.* La seva producció és un mecanisme reversible de regulació del creixement (46). Aquest fet implica que aquests són compostos propis de l'anabolisme dels fongs i que poden no ser produïts com a reaccions complementàries o secundàries als processos de degradació per a l'obtenció de recursos.

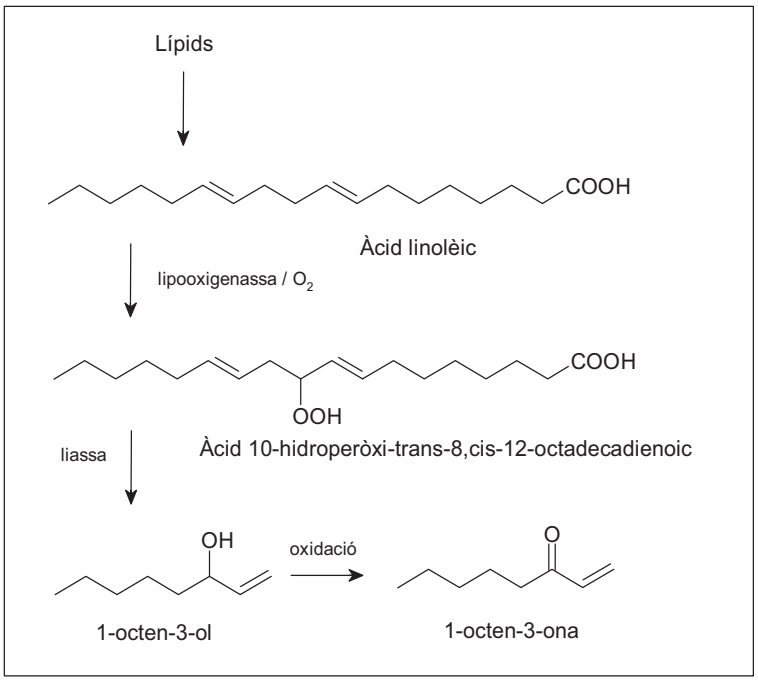

Figura 12. Mecanisme de formació de 1-octen-3-ol i la seva corresponent cetona a partir de lípids.

D'aquests dos compostos, el que es detecta majoritàriament en vi és la cetona, mentre que l'alcohol es troba en una proporció molt menor (47). La cetona té un llindar de percepció molt més baix que l'alcohol (20 ng/l i 20 μg/l, respectivament en vi), de manera que la seva contribució al defecte final és molt més important. Existeixen dos estereoisòmers de l'1-octen-3-ol, degut a la presència d'un centre asimètric en el carboni 3. Dels dos isòmers, només el R-(-)-1-octen-3-ol presenta aroma de bolet, l'altre és inodor.

2-metilisoborneol i geosmina

El 2-metilisoborneol i la geosmina (Figura 13) s'han detectat principalment com a contaminants en aigües d'ús urbà, peixos i altres organismes aquàtics (48, 49). Són coneguts com a metabòlits bacterians que es troben en ambients aquàtics (cianobacteris) i en el sòl (*Actinomycetes)* (23). Precisament aquest darrer fet afavoreix la contaminació de les planxes de suro si aquestes estan en contacte directe amb el terra. De tota manera és una font de contagi fàcil d'evitar amb una correcta manipulació de les matèries primes.

Aspergillus, Penicillium, Rizoctonia i *Trichoderma*, fongs que són habituals en el suro, també són capaços de sintetitzar-los (23, 45). La geosmina s'ha detectat també com a metabòlit de *Botrytis cinerea* -microorganismes que han estat aïllats en grans de raïm (50) - la qual cosa pot suposar una contaminació del vi que és independent del contacte amb el suro. D'altra banda, aquests dos compostos poden ser degradats per bacteris del gènere *Pseudomonas* i *Bacillus*, fet que tindria un efecte desodoritzant (51-53).

Des del punt de vista del procés bioquímic de la seva síntesi el 2-metilisoborneol pot provenir d'un monoterpè (C-10), després de l'addició d'un grup metil provinent de la S-adenosilmetionina, mentre que la geosmina pot venir d'un sesquiterpé bicíclic (C-15), el qual perd un grup isopropil. La geosmina presenta diferents isòmers: el que té un aroma més intens a terra i humitat és el trans-1,10-dimetil-trans-9-decalol.

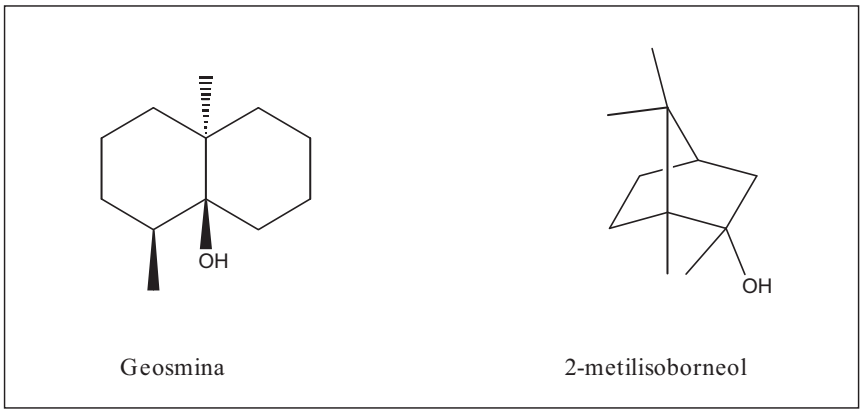

Figura 13. Estructura química de la geosmina i el 2-metilisoborneol

Segons alguns autors, la geosmina causa menys problemes en el vi que d'altres compostos, degut a la seva degradació en medi àcid, que fa que tingui una vida mitja de 8 setmanes a un pH de 3,2 i a 25 ºC de temperatura (43). La seva descomposició dóna lloc a subproductes amb poca càrrega odorífera. Això no vol dir que es pugui menysprear el seu efecte, ja que s'ha detectat geosmina en vins analitzats després de 7 mesos de la fermentació i, fins i tot, al cap de dos d'anys d'envelliment (28).

2-metoxipirazines

Dins aquest grup s'hi troben compostos amb olors molt diferents: de fong, d'humit i vegetal entre altres, considerats també causants directes o potenciadors del gust de florit.

S'han proposat diferents rutes sintètiques per a la formació de les 3-alquil-2-metoxipirazines (Figura 14) (54) però no s'ha arribat a un consens sobre la seva validesa. La 3-isopropil-2-metoxipirazina (IPMP) s'ha determinat com a metabòlit de l'espècie *Pseudomonas perolens* (55, 56).

La informació sobre la síntesi biològica de les metoxipirazines és escassa. Alguns autors han aïllat, en matrius diferents del suro, alguns fongs i bacteris capaços de sintetitzar-les (55-60).

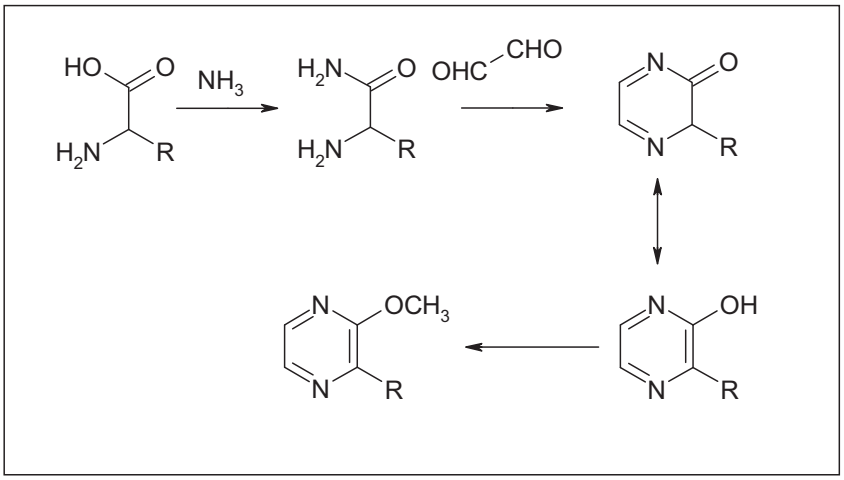

Figura 14. Ruta sintètica proposada per la formació de metoxialquilpirazines a partir d'aminoàcids i glioxal.

La 2-metoxi-3,5-dimetilpirazina (MDMP) s'ha considerat el principal compost responsable del defecte gust de florit després del TCA, amb una característica olor de fong i un llindar de percepció extremadament baix (2 ng/l en vi i 0,4 ng/l en aigua) que fan molt complicada la seva anàlisi.

En relació a la importància de la incidència d'aquestes pirazines en l'aparició de males olors en vins, val a dir que presenten una afinitat molt baixa pel suro (61), el que pot facilitar la seva transferència del tap al vi. Per contra, la seva elevada volatilitat porta a creure que els rentats amb aigua bullent o vapor que es porten a terme a la indústria surera, poden ser una manera fàcil de reduir o eliminar la seva influència en el gust de florit.

1.4 Mètodes analítics per determinar compostos volàtils en matrius sòlides.

La determinació dels compostos causants del gust de florit és un tema que genera cada vegada més interès. Si bé a l'inici els estudis s'encaminaven principalment a l'anàlisi del TCA, actualment s'ha pres consciència de la importància de detectar també els seus precursors (clorofenols) i els altres compostos esmentats que poden contribuir a aquest defecte sensorial.

El suro és una matriu extremadament complexa, on s'hi pot trobar un gran nombre de compostos de famílies químiques, propietats i concentracions diferents. D'aquí ve la dificultat de trobar una metodologia adequada, capaç de discriminar els compostos d'interès de la resta de components de la matriu. Si els compostos d'interès són volàtils o semi-volàtils la tècnica analítica més emprada és la cromatografia de gasos. Per a la determinació de compostos en suro les dues tècniques més usades són la cromatografia de gasos (GC) i la cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC). La cromatografia líquida ha estat utilitzada per alguns autors per a la determinació de clorofenols (62) degut a què, per les seves propietats físiques i químiques, són poc adequades per a l'anàlisi per GC. No obstant això, la majoria d'autors opta per derivatitzar-los i així determinar-los mitjançant GC (63-65). La cromatografia de gasos és la opció preferida per a l'anàlisi de tot tipus de components volàtils (32, 66-68). Aquesta

tècnica ofereix una elevada resolució i es pot acoblar a un gran nombre de detectors diferents.

El baix llindar de percepció que tenen la majoria dels analits relacionats amb defectes sensorials, fa que sigui necessària una etapa de preconcentració per assolir el mateix límit de detecció instrumental que a través d'una anàlisi sensorial. Hi ha descrites un gran nombre de tècniques de preconcentració segons les característiques dels analits i la matriu a estudiar. Els mètodes més habituals en el tractament de matrius sòlides són l'extracció amb dissolvent (69, 70), l'extracció amb fluids supercrítics (71) i la purga i trampa (72-74). Actualment es tendeix a la cerca de mètodes ràpids, sensibles, selectius, poc laboriosos, automatitzables i amb baix consum de reactius perjudicials per el medi ambient. Per això, la tècnica que s'ha imposat sobre totes les altres és la microextracció en fase sòlida (SPME), àmpliament utilitzada per mostres aquoses i mescles etanol-aigua. L'aplicació d'aquesta tècnica a les matrius sòlides com el suro requereix l'addició d'algun tipus de dissolvent que afavoreixi que els compostos es desplacin a l'espai de cap; en cas contrari la resposta d'alguns compostos es pràcticament nul·la (75). La preparació de patrons també és més complexa quan la mostra és un sòlid.

1.4.1 Microextracció en fase sòlida (SPME)

La microextració en fase sòlida és una tècnica de preparació de mostra desenvolupada per Janus Pawlinszyn a començaments dels anys 90 (76-78). Aquesta tècnica s'ha implantat en l'anàlisi d'una gran varietat de matrius (gasoses, líquides i sòlides) i famílies químiques diverses degut a la seva versatilitat.

En un procés analític, la preparació de mostra és, generalment, la que requereix un temps més llarg, ja que sol implicar diferents etapes per tal d'extreure, concentrar i a vegades separar els diferents analits. El principal avantatge de la SPME és que els processos d'extracció i concentració es duen a terme de manera simultània, la qual cosa suposa un estalvi important de temps. A més, aquesta tècnica no requereix l'ús de dissolvents orgànics, molt important des del punt de vista mediambiental, i l'instrumental

que requereix és senzill (s'utilitza una xeringa modificada o *holder*, Figura 15) i fàcilment automatitzable.

La SPME es pot dur a terme de dues formes: la més freqüent consisteix en situar la fibra a l'espai de cap de la mostra *(headspace HS)*; en l'altra, la fibra s'introdueix dins la mostra (extracció directa).

La tècnica es basa en la partició de l'analit entre una fase extractant, immobilitzada en una fibra de sílice fosa, i la matriu que el conté, seguit d'una desorció de l'extracte dins l'instrument d'anàlisi. L'extracció es pot considerar completa quan s'assoleix l'equilibri entre la matriu i la fibra. A partir d'aquest moment (temps d'equilibri) la quantitat extreta es manté constant, independentment del temps d'extracció.

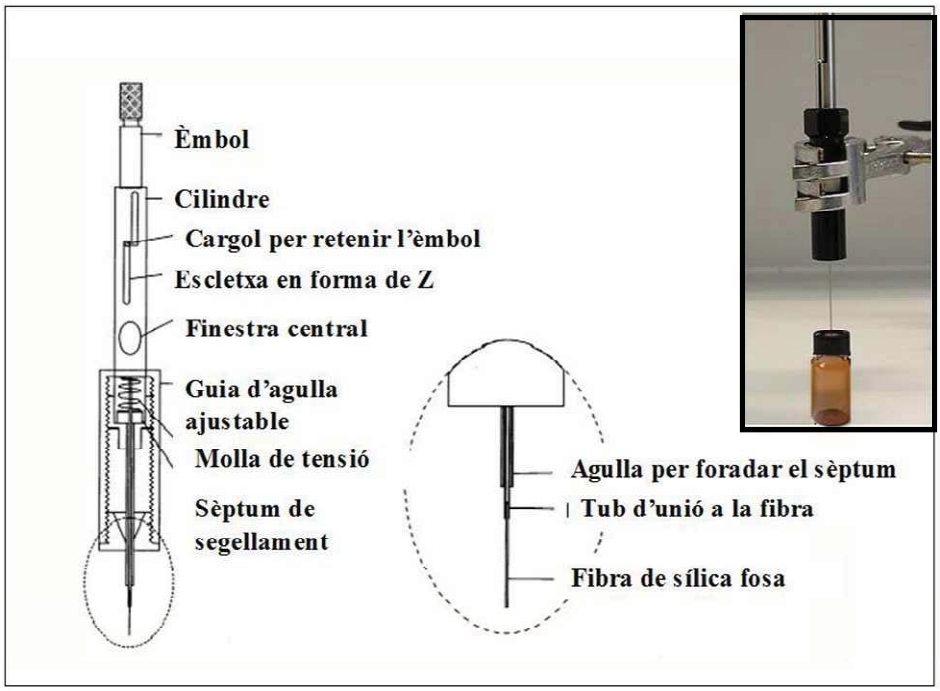

Figura 15. Disseny (79) i fotografia del *holder* per SPME comercialitzat per Supelco.

Treballant en les condicions adequades els límits de detecció són molt similars amb el sistema de *headspace* o en extracció directa (76-78) però utilitzant HS-SPME, s'evita el deteriorament de la fibra per l'absorció de substàncies amb elevat pes molecular i d'interferències no volàtils durant el procés d'extracció.

Paràmetres que influeixen en l'anàlisi

En una extracció en *headspace*, es pot relacionar la quantitat d'analit absorbida a la fibra amb la concentració inicial present a la mostra en condicions d'equilibri amb l'equació:

$$n = \frac{K_{fs} \cdot V_f \cdot C_0 \cdot V_s}{K_{fs} \cdot V_f + K_{hs} \cdot V_h + V_s} \quad \text{eq 1}$$

on:

n: quantitat adsorbida a la fibra

K_{fs}: constant de distribució de l'analit entre el recobriment de la fibra i la matriu

K_{hs}: constant de distribució de l'analit entre el *headspace* i la matriu

V_f: volum de recobriment a la fibra

V_s: volum de mostra

V_h: volum de *headspace*

C_0: concentració inicial d'analit a la mostra

els valors de les constants, K_{fs} i K_{hs}, i el volum de recobriment de la fibra, Vf, depenen del model de fibra utilitzat i les condicions en les que es realitza l'extracció i concentració. Alguns dels efectes de les variables més influents es discuteixen a continuació.

Naturalesa de l'absorbent: La quantitat d'analit extret dependrà de la constant de distribució entre el recobriment de la fibra i la matriu. Aquest paràmetre depèn de l'absorbent utilitzat, el qual determina la selectivitat per l'analit respecte altres components de la matriu. Actualment es poden trobar en el mercat diferents tipus d'absorbents adequats a una gran varietat d'aplicacions (Taula 3).

La fibra s'escull segons els analits a determinar, generalment segons el principi "similar dissol similar", per tant s'escolliran absorbents apolars com el polidimetilsiloxà (PDMS) per analits apolars, com els hidrocarburs aromàtics i absorbents polars com el

poliacrilat (PA) per analits polars, especialment fenols i alcohols. La fibra PDMS és la més utilitzada ja que a part d'una bona interacció amb compostos apolars, també permet l'absorció de compostos polars si s'optimitzen les condicions d'extracció (pH, addició de sal i temperatura) (80). També hi ha fibres mesclades, que contenen divinilbenzè (DVB), resina (templated resin, TR) , polímers d'etilè (carbowax, CWX) o carbó porós activat (carboxen, CAR). Aquestes fibres incrementen la capacitat d'extracció per acció de l'augment de l'absorció i la distribució a la fase estacionaria. Les fibres combinades PDMS-DVB, CAR-DVB, CW-DVB i CW-TR són adequades per a l'extracció de compostos volàtils amb un pes molecular petit i analits polars. La fibra de CAR-PDMS presenta una eficiència d'extracció major que una fibra de 100μm de PDMS però la repetibilitat és pobra i necessita d'un temps més llarg per arribar a l'equilibri (81). Per últim la fibra CAR/DVB/PDMS es recomana per anàlisi de components volàtils en matrius aquoses.

Taula 3. Absorbents disponibles per SPME i les seves característiques (80) . PDMS: polidimetilsiloxà, PA: poliacrilat, DVB: divinilbenzè, CAR: carboxen, CW: carbowax, TR: resina templada

Absorbents per SPME	Gruix d'absorbent (μm)	Ús	Aplicacions
PDMS	100 30 7	GC, HPLC GC, HPLC GC, HPLC	Compostos orgànics apolars: VOC's, hidrocarburs aromàtics policíclics, pesticides organoclorats...
PA	85	GC, HPLC	Compostos orgànics polars: triazines, pesticides organofosforats, fenols...
PDMS-DVB	65 60	GC, HPLC GC	VOC's, hidrocarburs aromàtics i amines aromàtiques.
CAR-PDMS	75	GC	VOC's i hidrocarburs
CW-DVB	65	GC	Compostos orgànics polars: alcohols, cetones i nitroaromàtics
CW-TR	50	HPLC	Surfactants aniònics i amines aromàtiques
DVB-CAR-PDMS	50/30	GC	Compostos aromàtics volàtils i semivolàtils

Pel que fa referència al gruix de la fibra, els compostos volàtils necessiten una capa més gruixuda d'adsorbent mentre que pels semivolàtils són efectives capes més primes. A més cal tenir en consideració que com més gruixuda és una fibra més temps es necessita per arribar a l'equilibri però presenta una major sensibilitat doncs tenen la capacitat d'extreure una major quantitat d'analits.

Altres paràmetres que cal optimitzar en desenvolupar un mètode d'extracció amb SPME són: temperatura, pH, força iònica i temps d'extracció. La **temperatura** afecta la sensibilitat i la cinètica d'extracció. L'augment de temperatura incrementa la difusió dels analits de la matriu cap al *headspace* millorant l'extracció però com a contrapartida, com que l'absorció és un procés exotèrmic disminueix la constant de distribució entre la fibra i la fase gasosa. El **pH** s'ha d'ajustar a un valor tal que les espècies d'interès es trobin en forma neutre: si hi ha espècies àcides o bàsiques en forma ionitzada no seran extretes de la matriu. L'**addició de sals** a la mostra, generalment NaCl, provoca un augment de la força iònica de la dissolució aquosa que fa que els compostos orgànics siguin menys solubles i n'afavoreix el pas a la fase gas i d'aquesta manera l'adsorció sobre la fibra. Un altre factor a tenir en compte és el **temps d'extracció**, que és important en la viabilitat d'un mètode d'anàlisi. Aquest ve determinat per la velocitat d'agitació (que afavoreix el pas dels analits de la mostra a la fibra, reduint el temps per arribar a l'equilibri) i pel coeficient de distribució entre la fibra i la mostra. Tot i que la SPME proporciona una màxima sensibilitat quan s'assoleix l'equilibri, es poden obtenir mesures precises i acurades sense arribar a l'estat d'equilibri sempre i quan es treballi en unes condicions exactament reproduïbles (82, 83); (84)}}, permetent així disminuir el temps necessari per a l'anàlisi.

Aplicacions de l'SPME en l'anàlisi de cloroanisoles, clorofenols, geosmina, 2-metilisoborneol i alquil-2-metoxipirazines.

Es pot consultar una àmplia bibliografia sobre l'ús de l'SPME per a l'anàlisi de compostos volàtils causants de defectes sensorials en diferents matrius. En el cas del

suro, el més habitual és analitzar la dissolució resultant de la maceració en aigua o solució hidroalcohòlica, ja que l'extracció directa de la mostra sòlida és menys eficient.

Fischer va proposar el 1997 un dels primers mètodes per a l'anàlisi de TCA, en vins i macerats de suro, mitjançant SPME (85), i Evans va desenvolupar un mètode, també per a mostres de vi, que utilitzava el TCA deuterat com a patró intern (66). En la majoria de treballs la fibra utilitzada per a la determinació de cloroanisoles és la PDMS. Riu e*t al.* ha estudiat el comportament d'altres tipus de fibres per l'anàlisi de TCA, arribant a la conclusió, que si bé amb la fibra CAR/DVB/PDMS s'obté una millor sensibilitat, la repetibilitat és molt menor que la PDMS (86). Tot i que la majoria d'estudis van encaminats al desenvolupament de mètodes per l'anàlisi de TCA en vins, l'ús del macerat de suro en aigua com a eina per detectar defectes sensorials ha fet que es desenvolupin també mètodes directament en suro o en matriu aquosa (87-89). També s'han desenvolupat mètodes per a l'extracció simultània de diferents cloroanisoles (87, 88, 90, 91).

Malgrat que en un principi no es consideraven entre els responsables del gust de florit, està acceptat que els clorofenols poden ser responsables de l'origen d'aquest defecte (veure apartat 1.3.1). És per això que han aparegut mètodes per la seva detecció, principalment en vins (92, 93), però també en matriu aquosa (94). Les característiques particulars d'aquests compostos (compostos polars, àcids febles en dissolució aquosa) fan que en la majoria de mètodes s'opti per una derivatització, generalment una acetilació, per obtenir una millor extracció i resolució en l'anàlisi per GC. Els mètodes per a la detecció conjunta de clorofenols i cloroanisoles utilitzant SPME no són, de moment, tan habituals. Aquest fet pot ser degut a la necessitat d'una etapa de derivatització dels clorofenols que pot interferir en l'extracció dels cloroanisoles. Martínez-Uruñuela *et al.* han descrit un mètode utilitzant la fibra DVB/CAR/PDMS, que obté bons resultats però amb un temps d'anàlisi llarg (84).

A diferència de cloroanisoles i clorofenols, els mètodes per a l'anàlisi de metilisoborneol i geosmina són principalment en matrius aquoses (28, 49, 95). La seva

anàlisi no es limita al camp de l'enologia ja que aquests dos compostos són contaminants habituals d'ambients aquàtics. La fibra utilitzada varia segons els autors però les que apareixen amb més freqüència són la PDMS/DVB (48, 96) i la CAR/DVB/PDMS (97). Per aquests estudis els compostos més utilitzats com a patró intern són els propis analits deuterats (d5-geosmina, i d3-metilisoborneol). Tot i que la majoria dels autors utilitzen l'SPME com a mètode d'extracció també n'existeixen d'altres, com per exemple l'extracció amb dissolvent (28, 49, 95) o mètodes d'espai de cap dinàmic com el *closed-loop-stripping* (28, 49, 95).

Els mètodes desenvolupats per a l'anàlisi d'alquil-metoxipirazines s'han descrit majoritàriament en vi com a matriu (32, 34), ja que aquests compostos es troben entre les aromes de varietats com el Cabernet sauvignon, el Merlot noir, el Sauvignon blanc i el Cabernet franc, entre d'altres. La fibra més utilitzada per a analitzar aquests compostos és la DVB/PDMS (98, 99).

Limitacions de l'SPME

Tot i els nombrosos avantatges que presenta l'SPME, també té alguns inconvenients. La qualitat de la fibra depèn del distribuïdor i per això l'absorció varia segons el lot del que es disposa. A més les fibres són molt fràgils i es poden trencar amb facilitat. També hi ha el perill que es contaminin amb compostos de difícil desorció que redueixin les seves propietats extractants. Cal tenir en compte també el mode de treball a l'hora de quantificar ja que si la mostra és prou neta es podrà treballar amb patró extern, però si la matriu és complexa, que és el més habitual, caldrà utilitzar altres tècniques com l'addició estàndard o el patró intern per minimitzar l'efecte matriu (78).

Malgrat aquests inconvenients, la precisió que s'obté és molt bona ja que s'eviten moltes fonts d'error associades a tractaments de mostra més elaborats. A més l'aparició constant de nous recobriments amplien el camp d'aplicació i els nous dispositius automatitzats milloren la reproductibilitat dels resultats, recolzant aquesta tècnica com a una sòlida alternativa als sistemes d'extracció convencionals.

1.4.2 Determinació de compostos "aroma-actius": les tècniques olfactomètriques

La cromatografia de gasos-olfactometria (GC/O) és una eina molt valuosa en la caracterització d'aromes d'aliments i begudes. Va ser descrita per primer cop el 1964 per Fuller *et al.* (100).

L'aroma de qualsevol substància és degut a l'efecte combinat d'un gran nombre de compostos volàtils de diferents propietats i concentracions. La influència individual de cadascun d'ells depèn de la seva capacitat odorífera. Per això, els compostos determinants en un aroma sovint no són els que apareixen a concentració més elevada i, compostos que apareixen a nivell de traça poden ser els que proporcionen la nota olfactòria més influent.

La tècnica GC-O es basa en l'avaluació olfactomètrica de l'eluent a la sortida de la columna cromatogràfica, per tal de discernir quins són els compostos més actius odoríficament. La detecció l'efectua un panell de vàries persones anomenades *sniffers*. Aquests *sniffers* són entrenats sensorialment a través de l'olfacció de dissolucions patró dels principals odorants que es poden trobar a la matriu d'estudi.

El disseny de la majoria de ports olfactomètrics és similar: l'eluent de sortida de la columna és enviat, a través d'una línia de transferència, a un port de vidre o PTFE que té forma de nas. La línia s'escalfa per prevenir la condensació dels analits semi-volàtils. S'afegeix a l'eluent una entrada de gas auxiliar, que consisteix en aire humidificat per evitar la sequedat a les membranes mucoses dels *sniffers*.

La preparació de mostres quan s'utilitza la GC-O es porta a terme de la mateixa manera que amb altres tipus de detectors. Per tal de separar i preconcentrar els analits d'interès es pot utilitzar un ampli ventall de tècniques: SPE, SPME, extracció amb solvent. Una tècnica utilitzada per tal d'emular el processat dels compostos aromàtics durant la ingestió és la boca artificial (101, 102). Aquest dispositiu consisteix en un flascó tancat on

es diposita la mostra, que s'agita contínuament i es manté a una temperatura constant de 37ºC. Un flux constant de nitrogen circula a través de la mostra i arrossega els compostos volàtils cap a un cartutx d'SPE on són adsorbits i posteriorment s'elueixen amb un dissolvent adequat i es concentren fins al volum desitjat.

La GC-O permet realitzar anàlisis quantitatives a través de diferents mètodes:

1. **Mètodes de llindar de dilució:** proporcionen una quantificació del potencial d'un determinat compost basat en la relació entre la seva concentració a la mostra i el seu llindar sensorial en aire (103). La metodologia que se segueix consisteix en preparar una sèrie de dilucions de l'extracte d'estudi, els quals són avaluats sensorialment, determinant fins a quina dilució es detecta cadascun dels compostos. Dintre d'aquests mètodes els més comuns són *Combined Hedonic Aroma Response Measurement* (CHARM) i *Aroma Extract Dilution Analysis* (AEDA). El principal inconvenient d'aquests mètodes és que no són consistents amb les lleis físiques, perquè suposen una relació lineal entre concentració i intensitat (102-104).

2. **Mètodes d'estimació de la intensitat:** A més d'avaluar la presència / absència dels compostos es mesura també la intensitat i duració de la resposta de cada compost. Dintre d'aquests mètodes podem trobar els mètodes de temps-intensitat en què s'enregistra la intensitat en funció del temps (OSME) i els mètodes de post-intensitat (102-104).

3. **Mètodes de freqüència de detecció:** en aquest mètode un panell de 6 o 8 *sniffers* analitza la mateixa mostra i es determina el percentatge de participants que han detectat cada odorant. Els compostos detectats amb més freqüència tenen més pes a l'aroma global. Aquest mètode no discrimina la intensitat amb que és detectat cada compost: dos compostos diferents detectats pel mateix nombre de persones tindran la mateixa importància. Per tal de corregir aquest fet s'utilitza una versió d'aquest mètode, el mètode de freqüències normalitzades en què el valor de freqüència de detecció es

pondera segons un valor d'intensitat assignat pels *sniffers*. L'avantatge fonamental dels mètodes de freqüència de detecció és la seva simplicitat, rapidesa i repetibilitat (104).

Les tècniques sensorials són molt utilitzades en la identificació de compostos odorants causants de defectes olfactius com a complement de les tècniques cromatogràfiques. Un exemple n'és la identificació per primera vegada del TCA com a odorant responsable de l'olor de florit (105). La GC-O s'usa també en la caracterització de nous compostos odorants, principalment en aliments i begudes ((106-109). També s'ha utilitzat per a l'estudi de compostos presents en suro amb diferents defectes (110, 111) i en la comparació del perfil aromàtic de taps de suro i sintètics (110).

1.5 Mètodes moleculars per a la identificació de microorganismes

Fins fa pocs anys era imprescindible l'aïllament de cultius per qualsevol procés d'identificació de microorganismes. Però les tècniques tradicionals de classificació microbiana que es basen en caràcters fenotípics no són massa útils en l'estudi de la diversitat bacteriana degut, per una banda a l'absència de trets morfològics característics en la majoria de microorganismes i per l'altra a l'elevada inversió de temps que caldria per realitzar una caracterització fisiològica dels aïllats. A més, els índexs de culturabilitat dels microorganismes presents en una mostra ambiental solen ser molt baixos, del 0,1 % al 10% (112), fent inviable obtenir una mostra representativa de la diversitat mitjançant tècniques de cultiu. Els avenços en les tècniques moleculars, basades en l'anàlisi de seqüències de marcadors moleculars o gens, han fet possible l'estudi de microorganismes sense la necessitat de cultivar-los i aïllar-los al laboratori. Tanmateix, les tècniques moleculars extensives, com per exemple la clonació i seqüenciació de gens diana, tenen l'inconvenient que requereixen un elevat esforç en temps, treball i diners (113). Una alternativa són les tècniques de *fingerprinting* que proporcionen informació de la riquesa genètica d'una comunitat microbiana d'una manera ràpida i senzilla. Aquestes tècniques es basen, en general, en mètodes físics de separació de l'ADN i presenten avantatges respecte a la clonació sobretot en el tractament i comparació simultània de nombres

elevats de mostres. Existeixen vàries tècniques, entre d'altres: LMWRNA (*Low molecular weight RNA fingerprinting*), SSCP (*Single-stranded-conformation polymorphism*), RAPD (*Randomly amplified polymorphism*), DGGE (*Denaturing gradient gel electrophoresis*), RFLP (*Restriction fragment lenght polymorphism*) i T-RFLP (*Terminal restriction fragment lenght polymorphism*). L'elecció d'una o altra tècnica es fa en funció del tipus de mostra i la informació que se'n vol obtenir. Els avantatges i inconvenients de cada tècnica es mostren a la Taula 4.

Taula 4. Resum de les principals característiques de les tècniques de *fingerprinting* més comunament usades en ecologia microbiana (113)

Tècnica	Avantatges	Inconvenients
LMWRNA	Senzill No necessita amplificació in vitro, (no es basa en PCR)	Degradació ràpida de RNA Informació filogenètica limitada Elevada heterogeneïtat de les mides
DGGE	Permet la identificació de membres de la comunitat	Fragments curts 300-600pb Dobles bandes Heterodúplex
SSCP	Permet la identificació de membres de la comunitat	Fragments curts 150-400 pb Problemes de reproductibilitat
RAPD	No cal disseny de *primers*	No dóna informació filogenètica Problemes de reproductibilitat
RFLP	Senzill Equipament econòmic	El nombre de bandes no es relaciona directament amb el de membres de la comunitat
TRFLP	Elevada resolució Marcadors a cada mostra Quantificació directa de fragments	No dóna informació filogenètica Equipament costós

La majoria de mètodes moleculars presenten algunes limitacions, les més importants lligades a la dificultat de recuperació, sense biaix, de quantitats proporcionals

d'ADN de tots els microorganismes presents a les mostres inicials. El procés d'extracció dels àcids nucleics implica la lisi de les cèl·lules que pot no ser igual per a totes les espècies presents. Per exemple els bacteris grampositiu són més resistents que els gramnegatiu i calen mètodes d'extracció més agressius per a assegurar l'extracció eficient d'ADN dels primers (114). Aquestes variacions fan que les proporcions relatives dels marcadors propis dels diferents microorganismes en la barreja obtinguda d'àcids nucleics pugui no ser totalment fidel a la proporció de cèl·lules inicial. No existeix, ara per ara, un mètode que ens asseguri una extracció total dels àcids nucleics presents a la mostra i el que es sol recomanar és la utilització d'un únic mètode per a totes les mostres per a evitar possibles heterogeneïtats. Cal recordar, no obstant, que l'ús de mètodes quantitatius convencionals basats en cultiu, es basen en un procés de selecció en relació al medi de cultiu i condicions d'enriquiment triats i resulten també en un enriquiment selectiu d'unes espècies en relació a unes altres.

Un altra aspecte a tenir en compte és que totes les tècniques exposades a la taula 4, excepte la LMWRA, es basen en l'amplificació prèvia de l'ADN extret mitjançant una reacció de PCR (*Polimerase Chain Reaction*).

L'amplificació de l'ADN per PCR és indispensable en la majoria de casos ja que la concentració obtinguda en el procés d'extracció és insuficient per a fer una anàlisi acurada directament. La PCR es basa en l'amplificació selectiva de fragments d'ADN (gens sencers o fragments que es coneixen amb el nombre de dianes) entre una població molt heterogènia. Aquesta amplificació selectiva es fa de forma seqüencial mitjançant una reacció enzimàtica en la que s'utilitza una polimerasa termoresistent (originalment purificada de *Thermus aquaticus -Taq-*) durant una sèrie de cicles d'amplificació que oscil·la entre 30 i 40. Idealment, a cada cicle d'amplificació es duplica la quantitat d'ADN diana i per tant l'amplificació és exponencial fins a la saturació de la reacció. La selectivitat en la reacció (ens permet recuperar un fragment diana en una barreja de 10^4 o 10^5 fragments no volguts) s'aconsegueix amb l'ús d'encebadors (*primers*) selectius. Els *primers* són fragments curts d'ADN (entre 15 i 30 parells de bases, bp) que s'aparellen de forma específica als extrems del fragment diana que es vol amplificar i, una vegada

aparellats, serveixen d'encebadors per a la reacció de la *Taq* polimerasa. Per aconseguir una bona reacció es repeteixen condicions de desnaturalització (separació de les cadenes complementaries), aparellament (unió dels primers a les dianes) i extensió (còpia del fragment diana), a cada cicle d'amplificació.

L'ús de la PCR no està exempt de múltiples biaixos dels quals cal ser plenament conscient per interpretar correctament els resultats obtinguts.

Hi ha diferents causes que poden distorsionar la diversitat real de la mostra quan s'usa la PCR com a mètode d'amplificació. Primer, les seqüències més abundants s'amplifiquen preferentment. Segon, les seqüències amb un percentatge elevat de guanina-citosina estan discriminades degut a la baixa eficiència de separació que tenen les cadenes durant l'etapa de desnaturalització, i que fa que no puguin ser copiades (114). Tercer, petites diferències en la seqüència del *primer* poden donar lloc a amplificacions selectives quan l'aparellament té lloc en condicions molt restrictives. Quart, un nombre de cicles superior a 35 provoca una tendència dels amplicons a assolir una proporció entre ells de 1:1, independentment de la seva diversitat inicial (115).

Un altre fenomen menys habitual que pot donar-se en una reacció de PCR són les quimeres, quan durant l'aparellament s'uneixen entre sí fragments resultants de l'amplificació de seqüències d'ADN diferents. No és un cas tan problemàtic com els anteriors degut a què, si bé podrien ser interpretats com a diversitat addicional, generalment aquest tipus de seqüències es troben en un percentatge molt baix (112) i són fàcilment detectables en anàlisis posteriors, per exemple amb la utilitat CHECK_CHIMERA del *Ribosomal Database Project* (RDP) (116).

Malgrat els inconvenients descrits, la PCR és una tècnica molt útil en ecologia microbiana. Coneixent els possibles problemes que es poden derivar de l'ús d'aquesta tècnica es pot actuar per evitar-los o minimitzar-los: optimitzant les condicions d'extracció de DNA i de reacció a la PCR, escollint *primers* específics pel fragment que es vol copiar, evitant condicions massa restrictives o massa poc, limitant el nombre de cicles

al voltant de 35, i fent un tractament de les seqüències per detectar possibles artefactes s'obté informació fiable de la diversitat de les mostres.

La majoria d'estudis de diversitat microbiana en mostres de suro que es poden trobar a la bibliografia utilitzen les tècniques tradicionals, basades en el cultiu i aïllament, per després identificar els microorganismes a través de característiques morfològiques (15-17, 19, 20). Estudis més recents complementen l'aïllament mitjançant cultius amb tècniques moleculars com la RFLP o la seqüenciació per a la identificació d'aïllats quan les característiques morfològiques no són suficients (11-13, 22). Fins el moment, però, no hi ha estudis d'anàlisi de la diversitat microbiana en suro que no depenguin d'una etapa inicial de cultiu.

1.5.1 DGGE (*Denaturing gradient gel electrophoresis*)

En aquest estudi s'ha utilitzat la tècnica de DGGE degut a què, a més de ser una de les tècniques de *fingerprinting* més utilitzades, permet una identificació posterior (fins a nivell d'espècie), dels marcadors diferencials. A més, no presenta massa problemes de reproductibilitat com altres tècniques moleculars com el RAPD.

Aquesta tècnica va ser descrita per primera vegada per Fisher i Lerman el 1979 (117). Desenvolupada inicialment per detectar mutacions puntuals en seqüències d'ADN, es va ampliar després el seu ús en l'estudi de la composició microbiana (118). Permet separar fragments d'ADN, de llargades similars però diferent seqüència de nucleòtids, en gels de poliacrilamida. La separació es basa en la disminució de mobilitat de l'ADN de doble cadena a mesura que avança per un gel amb un gradient desnaturalitzant d'urea i formamida. El punt de desnaturalització on el fragment d'ADN no pot continuar avançant i s'atura, depèn de la quantitat de guanina i citosina present a la seqüència i de la estabilitat de les estructures terciàries de les cadenes complementàries. Això fa que seqüències lleugerament diferents (amplificades amb els mateixos primers, però de microorganismes diferents) tinguin un comportament diferencial durant la migració i es puguin separar. Els amplicons obtinguts per una mateixa mostra després d'una PCR

formaran una pauta de bandes que serà més complexa com més riquesa hi hagi a la mostra (Figura 16). Tal i com ja s'ha comentat a la introducció aquesta és una tècnica d'ús molt comuna en ecologia microbiana (113).

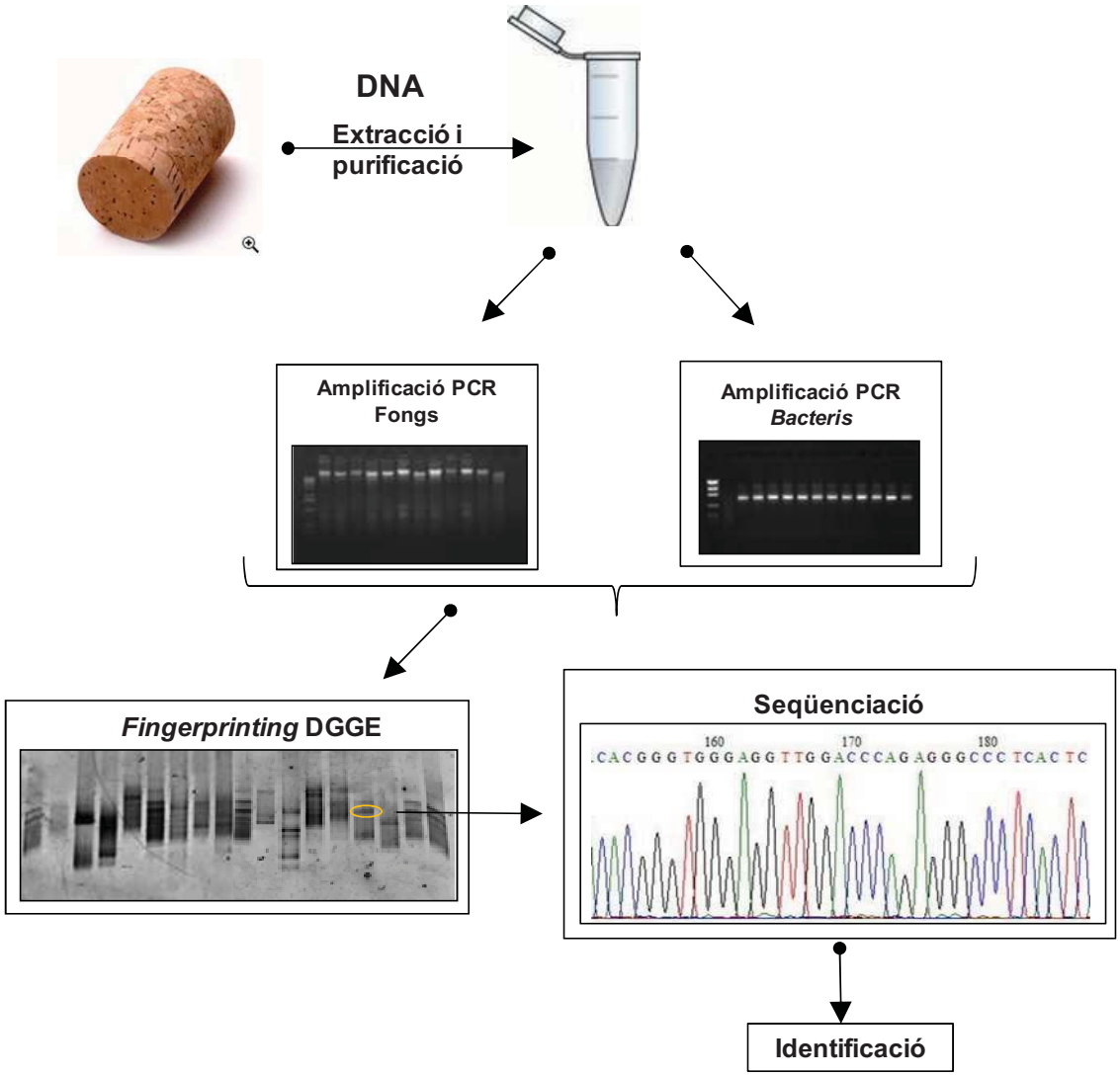

Figura 16. Esquema general del procés emprat per a la identificació de microorganismes mitjançant PCR-DGGE en mostres de suro.

Un dels inconvenients d'aquesta tècnica és l'aparició de bandes dobles que en realitat corresponen a una mateixa espècie. Aquest no és un problema molt important, doncs s'han descrit modificacions de les condicions de PCR per evitar aquestes dobles bandes (119) i, si no fos possible evitar-les, quan es duu a terme la identificació es comprova si efectivament són espècies diferents.

Les regions d'ADN que tenen un major interès en els estudis de filogènia de fongs i llevats són els que codifiquen l'ARN ribosòmic. Principalment els gens 18S rRNA i 5,8S rRNA i els espais interns transcrits ITS1 i ITS2. Aquestes regions no codificants, ITS, presenten una gran variabilitat entre espècies i són més susceptibles d'acumular mutacions i per tant àmpliament usades en l'estudi de la riquesa i diversitat en mostres ambientals i en la identificació acurada de les espècies fúngiques que hi són presents (120, 121). Per a *Bacteria*, en canvi, el fragment més utilitzat és el gen 16S rRNA (122). Aquesta zona inclou regions amb gran diversificació que permeten diferenciar entre els grups filogenètics més abundants d'aquests microorganismes. Tot i que els gens o marcadors esmentats són els preferits en estudis exploratoris, cal recordar que l'ús de la DGGE ofereix una bona separació amb fragments diana de 300 a 600 parells de bases, el que fa que generalment no s'usin els gens 16S rRNA (bacteris) i ITS1-5,8S-ITS2 (fongs) complets.

1.6 Les tècniques d'anàlisi multivariant aplicades al camp de l'anàlisi de volàtils

Les tècniques d'anàlisi multivariants permeten l'avaluació i consideració simultània de dades que depenen de totes les variables observades, ajudant a correlacionar paràmetres i facilitant la interpretació dels resultats.

Un dels primers camps d'aplicació de les tècniques d'anàlisi multivariant fou l'estudi de dades mediambientals i s'ha estès a altres camps de la química que treballen amb un gran volum de dades com és el cas de l'anàlisi de volàtils en mostres diverses o l'anàlisi de la diversitat microbiana.

Hi ha tres nivells d'anàlisi multivariant:

L'anàlisi exploratori de dades, s'utilitza per posar de manifest i ressaltar la informació continguda a la matriu de dades. Amb l'ús de representacions gràfiques s'obté

una visió ràpida i intuïtiva de les relacions entre aquestes. Aquesta exploració es pot fer amb una correlació múltiple o amb un dendrograma. Però la tècnica més usada en el tractament de dades ambientals i d'aliments és l'anàlisi per components principals (PCA). El PCA és una tècnica estadística que té com a objectiu la síntesi de la informació, o reducció de la dimensió (número de variables). És a dir, davant un grup de dades amb un nombre elevat variables que poden dificultar el reconeixement de pautes, l'objectiu serà reduir-les al menor nombre possible, perdent la menor quantitat d'informació. Així es determina la importància relativa d'unes variables respecte les altres. Aquesta tècnica s'ha utilitzat en l'anàlisi de dades cromatogràfiques de components volàtils en la caracterització de vins segons diferents propietats: origen, varietat i temps d'envelliment (123), denominacions d'origen (124) o com a primer pas en la caracterització de taps de suro segons la procedència geogràfica del suro emprat en la seva fabricació (125).

Un segon nivell és **l'estudi classificatori** en què es pretén establir la probabilitat de pertinença dels objectes a grups o categories predefinides. En aquest cas per construir el model és necessari disposar d'un conjunt d'entrenament, una mostra d'objectes de categoria coneguda. Entre aquestes tècniques destaquen l'anàlisi discriminant i les xarxes neuronals. L'anàlisi discriminant és una tècnica multivariant de classificació de individus en la qual es pressuposa l'existència de dos o més grups ben definits a priori. L'objectiu és descriure les diferències existents entre els grups en funció dels valors que prenen determinades variables. Aquesta descripció té valor predictiu i permet classificar mostres noves en els grups preexistents. Les xarxes neuronals d'altra banda intenten imitar el funcionament de les neurones humanes, no es basen en un model algebraic explícit sinó en un conjunt de nodes connectats entre si en forma de xarxa. Aquesta xarxa "aprèn" mitjançant l'ajust dels pesos de les connexions entre neurones fins que la xarxa en conjunt proporciona prediccions amb la precisió suficient. L'estudi classificatori té una gran utilitat en el tractament de dades cromatogràfiques per tal de reduir el nombre de compostos que cal analitzar per obtenir una bona caracterització d'un sistema. Permet dedicar l'esforç de l'anàlisi a les variables que proporcionen informació rellevant. Aquestes tècniques s'han aplicat a propòsits tan diferents com la detecció de *Salmonella*

en verdures envasades mitjançant la determinació dels seus metabòlits volàtils (126, 127) o a l'estudi dels perfils volàtils de diferents cerveses (127)

L'últim nivell és **l'estudi quantitatiu**, en el qual es construeixen models de regressió capaços de predir unes variables a partir de les altres. Un exemple molt utilitzat en aquest camp és la tècnica de Mínims quadrats parcials (PLS), que utilitza les combinacions lineals de les variables més efectives en la predicció determinades a partir de l'assignació de pesos extra a les variables que mostrin una alta correlació amb les variables resposta. La PLS permet la predicció a partir d'un nombre de variables menor que d'altres tècniques semblants i per això és àmpliament utilitzada. S'ha aplicat en la caracterització de taps de suro segons el seu origen geogràfic (125, 128).

1.7 Referències

1. Riboulet, J.M. and Alegoet, C. Aspectos prácticos del taponado en vinos. *Ed. Bourgogne* **1986,**

2. Dossier La protecció del suro. *ACE Revista d'Enologia* **2001,** *1er trimestre,*

3. Howland, P.R.; Pollnitz, A.P.; Liacopoulos, D.; McLean, H.J.; Sefton, M.A. The location of 2,4,6-trichloroanisole in a batch of contaminated wine corks. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **1997,** *3,* 141-145.

4. Silva, S.P.; Sabino, M.A.; Fernandes, E.M.; Correlo, V.M.; Boesel, L.F.; Reis, R.L. Cork: properties, capabilities and applications. *International Materials Reviews* **2005,** *50,* 345-365.

5. Conde, E.; Cadahia, E.; Garcia-Vellejo, M.C.; Gonzalez-Adrados, J.R. Chemical characterization of reproduction cork from Spanish Quercus suber. *J. Wood Chem. Technol.* **1998,** *18,* 447-469.

6. Jackson R. L *Wine Science. Principles and Applications.* Academic: 2008; pp. 751.

7. Pereira, H. *Cork: biology production and uses.* Elsevier: 2007; pp. 346.

8. Maga, J.A. and Puech, J.L. Cork and alcoholic beverages. *Food Reviews International* **2005,** *21,* 53-54-68.

9. Jager, J.J. and Dieckmann, J. Cork-borne bacteria and yeast as potential producers of off-flavours in wine. *Australian journal of grape and wine research* **1996,** *2,* 35-41.

10. Davis, C.R.; Fleet, G.H.; Lee, T.H. The microflora of wine corks. *Austr. Grapegrover Winemaker* **1981,** *208,* 42-44.

11. Álvarez-Rodríguez, M.L.; López-Ocaña, L.; López-Coronado, J.M.; Rodríguez, E.; Martínez, M.J.; Larriba, G.; Coque, J.J. Cork taint of wines: role of the filamentous fungi isolated from cork in the formation of 2,4,6-trichloroanisole by o methylation of 2,4,6-trichlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002,** *68,* 5860-5869.

12. Serra, R.; Peterson, S.; CTCOR; Venancio, A. Multilocus sequence identification of Penicillium species in cork bark during plank preparation for the manufacture of stoppers. *Res. Microbiol.* **2008,** *159,* 178-186.

13. Álvarez-Rodríguez, M.L.; Belloch, C.; Villa, M.; Uruburu, F.; Larriba, G.; Coque, J.J. Degradation of vanillic acid and production of guaiacol by microorganisms isolated from cork samples. *FEMS Microbiol. Lett.* **2003,** *220,* 49-55.

14. Centeno, S. and Calvo, M.A. Mycotoxins produced by fungi isolated from wine cork stoppers. *Pakistan Journal of Nutrition* **2002,** *1,* 267-269.

15. Caldentey, P.; Fumi, M.D.; Mazzoleni, V.; Careri, M. Volatile compounds produced by microorganisms isolated from cork. *Flavour Frag. J.* **1998,** *13,* 185-188.

16. Danesh, P.; Velez Caldas, F.M.; Figueiredo Marques, J.J.; San Romao, M.V. Mycobiota in Portuguese 'normal' and 'green' cork throughout the manufacturing process of stoppers. *J. Appl. Microbiol.* **1997,** *82,* 689-694.

17. Oliveira, A.C.; Peres, C.M.; Correia Pires, J.M.; Silva Pereira, C.; Vitorino, S.; Figueiredo Marques, J.J.; Barreto Crespo, M.T.; San Romao, M.V. Cork stoppers industry: defining appropriate mould colonization. *Microbiol. Res.* **2003,** *158,* 117-124.

18. Prak, S.; Gunata, Z.; Guiraud, J.P.; Schorr-Galindo, S. Fungal strains isolated from cork stoppers and the formation of 2,4,6-trichloroanisole involved in the cork taint of wine. *Food Microbiol.* **2007,** *24,* 271-280.

19. Silva Pereira, C.; Pires, A.; Valle, M.J.; Vilas Boas, L.; Figueiredo Marques, J.J.; San Romão, M.V. Role of Chrysonilia sitophila in the quality of cork stoppers for sealing wine bottles. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **2000,** *24,* 256-261.

20. Berbegal, M.; Armengol, J.; García-Jiménez, J.; Roselló, J.; Matas, C. Aislamiento e identificación de hongos asociados a la mancha amarilla en corcho. *VIII Congreso Nacional de Enólogos, Santiago de Compostela (Espanya), 26-28 abril 2002*

21. Lefebvre, A.; Riboulet, J.M.; Boidron, J.N.; Ribéreau-Gayon, P. Incidence des micro-organismes du liège sur les alterations olfatives du vin. *Sci. Aliment.* **1983,** *3,* 265-278.

22. Villa-Carvajal, M.; Coque, J.J.; Alvarez-Rodriguez, M.L.; Uruburu, F.; Belloch, C. Polyphasic identification of yeasts isolated from bark of cork oak during the manufacturing process of cork stoppers. *FEMS Yeast Res.* **2004,** *4,* 745-750.

23. Silva Pereira, C.; Figueiredo Marques, J.J.; San Romao, M.V. Cork taint in wine: scientific knowledge and public perception: a critical review. *Crit. Rev. Microbiol.* **2000,** *26,* 147-162.

24. Rocha, S.M.; Delgadillo, I.; Ferrer Correia, A.J. GC-MS Study of volatiles of Normal and Microbiolocally Attacked Crk from *Quercus suber* L. *J. Agric. Food Chem.* **1996,** *44,* 865-871.

25. Mazzoleni, V.; Caldentey, P.; Careri, M.; Mangia, A.; Colagrande, O. Volatile components of cork used for production of wine stoppers. *Am. J. Enol. Vitic.* **1994,** *45,* 401-406.

26. Pollnitz, A.P.; Pardon, K.H.; Liacopoulos, D.; Skouroumounis, G.K.; Sefton, M.A. The analysis of 2,4,6-trichloroanisole and other chloroanisoles in tainted wines and cork. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **1996,** *2,* 184-190.

27. Darriet, P.; Pons, M.; Henry, R.; Dumont, O.; Findeling, V.; Cartolaro, P.; Calonnec, A.; Dubourdieu, D. Impact odorants contributing to the fungus type aroma from grape berries contaminated by powdery mildew (Uncinula necator); incidence of enzymatic activities of the yeast Saccharomyces cerevisiae. *J. Agric. Food Chem.* **2002,** *50,* 3277-3282.

28. Darriet, P.; Pons, M.; Lamy, S.; Dubourdieu, D. Identification and quantification of geosmin, an earthy odorant contaminating wines. *J. Agric. Food Chem.* **2000,** *48,* 4835-4838.

29. Sefton, M.A. and Simpson, R.F. Compounds causing cork taint and the factors affecting their transfer from natural cork closures to wine-a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2005,** *11,* 226-240.

30. Sala, C.; Busto, O.; Guasch, J.; Zamora, F. Contents of 3-alkyl-2-methoxypirazines in musts and wines from *Vitis vinifera* variety Cabernet Sauvignon: influence of irrigation and plantation density. *J. Sci. Food Agric.* **2005,** *85,* 1131-1136.

31. Sala, C.; Busto, O.; Guasch, J.; Zamora, F. Influence of vine training and sunlight exposure on the 3-alkyl-2-methoxypyrazines content in musts and wines from the Vitis vinifera variety cabernet sauvignon. *J. Agric. Food Chem.* **2004,** *52,* 3492-3497.

32. Sala, C.; Mestres, M.; Marti, M.P.; Busto, O.; Guasch, J. Headspace solid-phase microextraction analysis of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wines. *J. Chromatogr. A* **2002,** *953,* 1-6.

33. Chatonnet, P.; Bonnet, S.; Boutou, S.; Labadie, M.D. Identification and responsibility of 2,4,6-tribromoanisole in musty, corked odors in wine. *J. Agric. Food Chem.* **2004,** *52,* 1255-1262.

34. Simpson, R.F.; Capone, D.L.; Sefton, M.A. Isolation and identification of 2-methoxy-3,5-dimethylpyrazine, a potent musty compound from wine corks. *J. Agric. Food Chem.* **2004,** *52,* 5425-5430.

35. Boutou, S. and Chatonnet, P. Rapid headspace solid-phase microextraction/gas chromatographic/mass spectrometric assay for the quantitative determination of some of the main odorants causing off-flavours in wine. *J. Chromatogr. A* **2007,** *1141,* 1-9.

36. Simpson, R.F. Cork taint in wine: A review of the causes. *Wine Industry Journal* **1990,** *5,* 286-296.

37. Allard, A.S.; Remberger, M.; Neilson, A.H. Bacterial O-methylation of halogen-substituted phenols. *Appl. Environ. Microbiol.* **1987,** *53,* 839-845.

38. Cserjesi, A.J. and Johnson, E.L. Methylation of pentachlorophenol by Trichoderma virgatum. *Can. J. Microbiol.* **1972,** *18,* 45-49.

39. Neilson, A.H.; Lindgren, C.; Hynning, P.A.; Remberger, M. Methylation of Halogenated Phenols and Thiophenols by Cell Extracts of Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **1988,** *54,* 524-530.

40. Maggi, L.; Mazzoleni, V.; Fumi, M.D.; Salinas, M.R. Transformation ability of fungi isolated from cork and grape to produce 2,4,6-trichloroanisole from 2,4,6-trichlorophenol. *Food Addit. Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess* **2008,** *25,* 265-269.

41. Coque, J.J.; Alvarez-Rodriguez, M.L.; Larriba, G. Characterization of an inducible chlorophenol O-methyltransferase from Trichoderma longibrachiatum involved in the formation of chloroanisoles and determination of its role in cork taint of wines. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003,** *69,* 5089-5095.

42. Jensen, N.; Varelis, P.; Whitfield, F.B. Formation of guaiacol in chocolate milk by the psychrotrophic bacterium Rahnella aquatilis. *Lett. Appl. Microbiol.* **2001,** *33,* 339-343.

43. Amon, J.M.; Vandepeer, J.M.; Simpson, R.F. Compounds responsible for cork taint in wine. *Aust. N. Z. Wine Ind. J.* **1989,** *4,* 62-69.

44. Kaminski, E.; Libbey, L.M.; Stawicki, S.; Wasowicz, E. Identification of the predominant volatile compounds produced by Aspergillus flavus. *Appl. Microbiol.* **1972,** *24,* 721-726.

45. Nilsson, T.; Larsen, T.O.; Montanarella, L.; Madsen, J.O. Application of head-space solid-phase microextraction for the analysis of volatile metabolites emitted by *Penicillium* species. *Journal of Microbiological Methods* **1996,** *25,* 245-255.

46. Chitarra, G.S.; Abee, T.; Rombouts, F.M.; Dijksterhuis, J. 1-Octen-3-ol inhibits conidia germination of Penicillium paneum despite of mild effects on membrane permeability, respiration, intracellular pH, and changes the protein composition. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2006,** *54,* 67-75.

47. La Guerche, S. Nature and origin of earthy and fingal "off flavours" in grapes and wine. *International Conference On Off-Flavours In Wine And Other Beverages: Origin, Detection & Control, Tarragona (Espanya) ,23-25 Novembre, 2005*

48. Watson, S.B.; Brownlee, B.; Satchwill, T.; Hargesheimer, E.E. Quantitative analysis of trace levels of Geosmin and MIB in source and drinking water using headspace SPME. *Wat. Res.* **2000,** *34,* 2818-2828.

49. Romero, J. and Ventura, F. Occurrence of geosmin and other odorous compounds of natural origin in surface and drinking waters. A case study. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* **2000,** *77,* 243-254.

50. La Guerche, S.; Chamont, S.; Blancard, D.; Dubourdieu, D.; Darriet, P. Origin of (-)-geosmin on grapes: on the complementary action of two fungi, botrytis cinerea and penicillium expansum. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2005,** *88,* 131-139.

51. Saadoun, I. and el-Migdadi, F. Degradation of geosmin-like compounds by selected species of gram-positive bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* **1998,** *26,* 98-100.

52. Saadoun, I. Production of 2-methylisoborneol by *Streptomyces violaceusniger* and its transformation by selected species of *Pseudomonas*. *J. Basic Microbiol* **2005,** *45,* 236-242.

53. Yagi, M.; Nakashima, S.; Muramoto, S. Biological degradation of musty odor compounds, 2-methylisoborneol and geosmin, in a bio-activated carbon filter. *Wat. Sci. Tech.* **1988,** *20,* 255-260.

54. Murray, K.E.; Shipton, J.; Whitfield, F.B. 2-methoxypyrazines and the flavour of green peas (Pisum sativum). *Chem. Ind.* **1970,** *27,* 897-898.

55. Cheng, T. and Reineccius, G.A. A study of factors influencing 2-methoxy- 3-isopropylpyrazine production by *Pseudomonas perolens* using acid trap and UV spectroscopy. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1991,** *36,* 304-308.

56. Cheng, T.B.; Reineccius, G.A.; Bjorklund, J.A.; Leetet, E. Biosynthesis of 2-Methoxy-3-isopropylpyrazine in *Pseudomonas perolenst*. *J. Agric. Food Chem.* **1991,** *39,* 1009-1012.

57. Besson, I.; Creuly, C.; Gros, J.B.; Larroche, C. Pyrazine production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation on soybeans. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1997,** *47,* 489-495.

58. Schulz, S. and Dickschat, J.S. Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Nat. Prod. Rep.* **2007,** *24,* 814-842.

59. Gerber, N.N. Three highly odorous metabolites from an actinomycete: 2- Isopropyl-3-methoxy-pyrazine, methylisoborneol, and geosmin. *J. Chem. Ecol.* **1977,** *3,* 475-482.

60. Dickschat, J.S.; Reichenbach, H.; Wagner-Döbler, I.; Schulz, S. Novel Pyrazines from the Myxobacterium *Chondromyces crocatus* and Marine Bacteria *Eur J Org Chem* **2005,** *2005,* 4141-4153.

61. Capone, D.L.; Sefton, M.A.; Pretorius, I.S.; Hoj, P.B. Flavour "scalping "by wine bottle closures. *Aust. N. Z. Wine Ind. J.* **2003,** *18,* 16-20.

62. Hill, J.L.; Hocking, A.D.; Whitfield, F.B. The role of fungi in the production of chloroanisoles in general purpose freight containers *Food Chem.* **1995,** *54,* 161-166.

63. Rodríguez, I.; Turnes, M.I.; Mejuto, M.C.; Cela, R. Determination of chlorophenols at the sub-ppb level in tapwater using derivatization, solid-phase extraction and gaschromatography with plasma atomic emission detection. *J. Chromatogr. A* **1996,** *721,* 297-304.

64. Insa, S.; Salvado, V.; Antico, E. Assays on the simultaneous determination and elimination of chloroanisoles and chlorophenols from contaminated cork samples. *J. Chromatogr. A* **2006,** *1122,* 215-221.

65. Insa, S.; Besalu, E.; Iglesias, C.; Salvado, V.; Antico, E. Ethanol/Water extraction combined with solid-phase extraction and solid-phase microextraction concentration for the determination of chlorophenols in cork stoppers. *J. Agric. Food Chem.* **2006,** *54,* 627-632.

66. Evans, T.J.; Butzke, C.E.; Ebeler, S.E. Analysis of 2,4,6-trichloroanisole in wines using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1997,** *786,* 293-298.

67. Insa, S.; Antico, E.; Ferreira, V. Highly selective solid-phase extraction and large volume injection for the robust gas chromatography-mass spectrometric analysis of TCA and TBA in wines. *J. Chromatogr. A* **2005,** *1089,* 235-242.

68. Ezquerro, O. and Tena, M.T. Determination of odour-causing volatile organic compounds in cork stoppers by multiple headspace solid-phase microextraction. *J. Chromatogr. A* **2005,** *1068,* 201-208.

69. Peña-Neira, A.; Fernández de Simón, B.; García-Vallejo, M.C.; Hernández, T.; Cadahía, E.; Suarez, J.A. Presence of cork-taint responsible compounds in wines and their cork stoppers. *Eur. Food Res. Technol.* **2000,** *211,* 257-261.

70. Mazzoleni, V.; Dallagiovanna, L.; Trevisan, M.; Nicelli, M. Persistent organic pollutants in cork used for production of wine stoppers. *Chemosphere* **2005,** *58,* 1547-1552.

71. Taylor, M.K.; Young, T.M.; Butzke, C.E.; Ebeler, S.E. Supercritical fluid extraction of 2,4,6-trichloroanisole from cork stoppers. *J. Agric. Food Chem.* **2000,** *48,* 2208-2211.

72. Beltran, J.; Serrano, E.; Lopez, F.J.; Peruga, A.; Valcarcel, M.; Rosello, S. Comparison of two quantitative GC-MS methods for analysis of tomato aroma based on purge-and-trap and on solid-phase microextraction. *Anal. Bioanal Chem.* **2006,** *385,* 1255-1264.

73. Campillo, N.; Vinas, P.; Lopez-Garcia, I.; Aguinaga, N.; Hernandez-Cordoba, M. Determination of volatile halogenated organic compounds in soils by purge-and-trap capillary gas chromatography with atomic emission detection. *Talanta* **2004,** *64,* 584-589.

74. Rosell, M.; Lacorte, S.; Barcelo, D. Simultaneous determination of methyl tert-butyl ether, its degradation products and other gasoline additives in soil samples by closed-system purge-and-trap gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2006,** *1132,* 28-38.

75. Llompart, M.; Li, K.; Fingas, M. Headspace solid phase microextraction (HSSPME) for the determination of volatile and semivolatile pollutants in soils. *Talanta* **1999,** *48,* 451-459.

76. Arthur, C.L. and Pawliszyn, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica fibers. *Anal. Chem.* **1990,** *62,* 2145-2148.

77. Zang, Z. and Pawliszyn, J. Headspace solid-phase microextraction. *Anal. Chem.* **1993,** *65,* 1843-1852.

78. Pawliszyn, J. Solid phase microexraction. Theory and practice. Wiley, New York, 1997.

79. Lord, H. and Pawliszyn, J. Evolution of solid-phase microextraction technology. *J. Chromatogr. A* **2000,** *885,* 153-193.

80. Alpendurada, M.F. Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. *J. Chromatogr. A* **2000,** *889,* 3-14.

81. Kataoka, H.; Lord, H.L.; Pawliszyn, J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *J. Chromatogr. A* **2000,** *880,* 35-62.

82. Ai, J. Headspace Solid Phase Microextraction.Dynamics and Quantitative Analysis beforeReaching a Partition Equilibrium. *Anal. Chem.* **1997,** *69,* 3260-3266.

83. Ai, J. Solid Phase Microextraction for Quantitative Analysis in Nonequilibrium Situations. *Anal. Chem.* **1997,** *69,* 1230-1236.

84. Martínez-Uruñuela, A.; González-Saiz, J.M.; Pizarro, C. Multiple solid-phase microextraction in a non-equilibrium situation. Application in quantitative analysis of chlorophenols and chloroanisoles related to cork taint in wine. *J. Chromatogr. A* **2005,** *1089,* 31-38.

85. Fischer, C. and Fischer, U. Analysis of Cork Taint in Wine and Cork Material at Olfactory Subthreshold Levels by Solid Phase Microextraction. *J. Agric. Food Chem.* **1997,** *45,* 1995-1997.

86. Riu, M.; Mestres, M.; Busto, O.; Guasch, J. Determination of 2,4,6-trichloroanisole in wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-electron-capture detection. *J. Chromatogr. A* **2002,** *977,* 1-8.

87. Riu, M.; Mestres, M.; Busto, O.; Guasch, J. Quantification of chloroanisoles in cork using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with electron capture detection. *J. Chromatogr. A* **2006,** *1107,* 240-247.

88. Riu, M.; Mestres, M.; Busto, O.; Guasch, J. Determination of total chloroanisoles in diferent kinds of cork stoppers. *Anal. Chim. Acta* **2006,** *563,* 310-310.

89. Pinheiro, P.B. and Esteves da Silva, J.C. Detection of 2,4,6-trichloroanisole in chlorinated water at nanogram per litre levels by SPME-GC-ECD. *Anal. Bioanal Chem.* **2005,** *382,* 341-346.

90. Lizarraga, E.; Irigoyen, A.; Belsue, V.; Gonzalez-Penas, E. Determination of chloroanisole compounds in red wine by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2004,** *1052,* 145-149.

91. Martínez-Uruñuela, A.; González-Saiz, J.M.; Pizarro, C. Optimisation of a headspace solid-phase microextraction method for the direct determination of chloroanisoles related to cork taint in red wine. *J. Chromatogr. A* **2004,** *1056,* 49-56.

92. Insa, S.; Salvado, V.; Antico, E. Development of solid-phase extraction and solid-phase microextraction methods for the determination of chlorophenols in cork macerate and wine samples. *J. Chromatogr. A* **2004,** *1047,* 15-20.

93. Berthod, R.; Flaction, O.; Frey, U. Fast determination of chlorophenols at the ppt level. A new analytical tool for quality control of cork stoppers? *Chimia* **2004,** *58,* 560-562.

94. Buchholz, K.D. and Pawliszyn, J. Optimization of Solid-Phase Microextraction Conditions for Determination of Phenols. *Anal. Chem.* **1994,** *66,* 160-167.

95. Lloyd, S.W.; Lea, J.M.; Zimba, P.V.; Grimm, C.C. Rapid analysis of Geosmin and 2-Methylisoborneol in water using solid phase micro extraction procedures. *Wat. Res.* **1998,** *32,* 2140-2146.

96. McCallum, R.; Pendleton, P.; Schumann, R.; Trinh, M.U. Determination of geosmin and 2-methylisoborneol in water using solid-phase microextraction and gas chromatography-chemical ionisation/electron impact ionisation-ion-trap mass spectrometry. *Analyst* **1998,** *123,* 2155-2160.

97. Sung, Y.H.; Li, T.Y.; Huang, S.D. Analysis of earthy and musty odors in water samples by solid-phase microextraction coupled with gas chromatography/ion trap mass spectrometry. *Talanta* **2005,** *65,* 518-524.

98. Sala, C.; Mestres, M.; Marti, M.P.; Busto, O.; Guasch, J. Headspace solid-phase microextraction method for determining 3-alkyl-2-methoxypyrazines in musts by means of polydimethylsiloxane-divinylbenzene fibres. *J. Chromatogr. A* **2000,** *880,* 93-99.

99. Prouteau, C.; Schneider, R.; Lucchese, I.; Nepveu, F.; Renard, R.; Vaca-Garcia, C. Improving headspace-solid-phase microextraction of 3-isobutyl-2-methoxypyrazine by experimental design with regard to stable isotope dilution gas chromatography-mass spectrometric analysis of wine. *Analytica Chimica Acta* **2004,** *513,* 223-227.

100. Fuller, G.H.; Steltenkamp, R.; Tisserand, G.A. The Gas Chromatograph with Human Sensor: Perfumer Model. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1964,** *116,* 711-724.

101. van Ruth, S.M. and Roozen, J.P. Gas chromatography/sniffing port analysis of aroma compounds released under mouth conditions. *Talanta* **2000,** *52,* 253-259.

102. d'Acampora Zellner, B.; Dugo, P.; Dugo, G.; Mondello, L. Gas chromatography-olfactometry in food flavour analysis. *J. Chromatogr. A* **2008,** *1186,* 123-143.

103. Delahunty, C.M.; Eyres, G.; Dufour, J.P. Gas chromatography-olfactometry. *J. Sep. Sci.* **2006,** *29,* 2107-2125.

104. Plutowska, B. and Wardencki, W. Application of gas chromatography-olfactometry (GC-O) in analysis and quality assessment of alcoholic beverages - A review. *Food Chem.* **2008,** *107,* 449-463.

105. Buser, H.R.; Zanier, C.; Tanner, H. Identification of 2,4,6-Trichloroanisole as a Potent Compound Causing Cork Taint in Wine. *J. Agric. Food Chem.* **1982,** *30,* 359-362.

106. Culleré, L.; Escudero, A.; Cacho, J.; Ferreira, V. Gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six premium quality spanish aged red wines. *J. Agric. Food Chem.* **2004,** *52,* 1653-1660.

107. Cantergiani, E.; Brevard, H.; Krebs, Y.; Feria-Morales, A.; Amadò, R.; Yeretzian, C. Characterisation of the aroma of green Mexican coffee and identification of mouldy/earthy defect. *Eur Food Res Technol* **2001,** *212,* 648-657.

108. Majcher, M.A. and Jelen, H.H. Identification of potent odorants formed during the preparation of extruded potato snacks. *J. Agric. Food Chem.* **2005,** *53,* 6432-6437.

109. Triqui, R. and Bouchriti, N. Freshness assessments of Moroccan sardine (Sardina pilchardus): comparison of overall sensory changes to instrumentally determined volatiles. *J. Agric. Food Chem.* **2003,** *51,* 7540-7546.

110. Culleré, L.; Cacho, J.; Ferreira, V. Comparative study of the aromatic profile of different kinds of wine cork stoppers. *Food Chem.* **2009,** *112,* 381-387.

111. Moio, L.; Diana, M.; Del Prette, G.; Di Landa, G.; Valentino, A.A. Analisi dei componenti volatili del sughero affetto da "macchia gialla" e "verdone" e di vini con odore di sughero mediante GC/Sniffing e GC/MS. *Ind. Bevande* **1998,** *27,* 615-619.

112. Amann, R.I.; Ludwig, W.; Schleifer, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **1995,** *59,* 143-169.

113. Muyzer, G. Genetic fingerprinting of microbial communities – present status and future perspectives. *Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology Bell CR, Brylinsky M, Johnson-Green P (ed) Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada* **1999,**

114. von Wintzingerode, F.; Gobel, U.B.; Stackebrandt, E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **1997,** *21,* 213-229.

115. Suzuki, M.T. and Giovannoni, S.J. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996,** *62,* 625-630.

116. Maidak, B.L.; Olsen, G.J.; Larsen, N.; Overbeek, R.; McCaughey, M.J.; Woese, C.R. The Ribosomal Database Project (RDP). *Nucleic Acids Res.* **1996,** *24,* 82-85.

117. Fisher, S.G. and Lerman, L.S. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell* **1979,** *16,* 191-200.

118. Muyzer, G.; de Waal, E.C.; Uitterlinden, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **1993,** *59,* 695-700.

119. Janse, I.; Bok, J.; Zwart, G. A simple remedy against artifactual double bands in denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Microbiol. Methods* **2004,** *57,* 279-281.

120. Anderson, I.C.; Campbell, C.D.; Prosser, J.I. Diversity of fungi in organic soils under a moorland--Scots pine (Pinus sylvestris L.) gradient. *Environ. Microbiol.* **2003,** *5,* 1121-1132.

121. Lord, N.S.; Kaplan, C.W.; Shank, P.; Kitts, C.L.; Elrod, S.L. Assessment of fungal diversity using terminal restriction fragment (TRF) pattern analysis: comparison of 18S and ITS ribosomal regions. *FEMS Microbiology Ecology* **2002,** *42,* 327-337.

122. Lozupone, C.A. and Knight, R. Global patterns in bacterial diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007,** *104,* 11436-11440.

123. Martí, M.P.; Busto, O.; Guasch, J. Application of a headspace mass spectrometry system to the differentiation and classification of wines according to their origin, variety and ageing. *J. Chromatogr. A* **2004,** *1057,* 211-217.

124. Gonzálvez, A.; Llorens, A.; Cervera, M.L.; Armenta, S.; de la Guardia, M. Elemental fingerprint of wines from the protected designation of origin Valencia. *Food Chem.* **2009,** *112,* 26-34.

125. Boudaoud, N. and Eveleigh, L. A new approach to the characterization of volatile signatures of cork wine stoppers. *J. Agric. Food Chem.* **2003,** *51,* 1530-1533.

126. Siripatrawan, U. and Harte, B.R. Solid phase microextraction/gas chromatography/mass spectrometry integrated with chemometrics for detection of Salmonella typhimurium contamination in a packaged fresh vegetable. *Anal. Chim. Acta* **2007,** *581,* 63-70.

127. Silva, G.A.d.; Augusto, F.; Poppi, R.J. Exploratory analysis of the volatile profile of beers by HS–SPME–GC. *Food Chemistry,* **2008,** *111,* 1057-1063.

128. Hajimahmoodi, M.; Vander Heyden, Y.; Sadeghi, N.; Jannat, B.; Oveisi, M.R.; Shahbazian, S. Gas-chromatographic fatty-acid fingerprints and partial least squares modeling as a basis for the simultaneous determination of edible oil mixtures. *Talanta* **2005,** *66,* 1108-1116.

2. OBJECTIUS

La incidència de defectes sensorials amb descriptors de florit-humitat és un dels principals problemes amb què s'enfronta la indústria surera. Inicialment tota la responsabilitat requeia en el TCA i la resta de compostos de la família dels cloroanisoles, i així és en molts dels casos analitzats. Això ha fet que la majoria dels estudis s'hagin focalitzat en aquests compostos i els seus precursors els clorofenols. Més recentment, l'aparició de nous compostos volàtils amb descriptors odorífers que es corresponen amb aquest defecte en anàlisis fetes a vins i suro, ha motivat la revisió dels mètodes d'anàlisi. Aquesta recerca s'ha fet amb l'objectiu principal de dotar a les empreses sureres de mètodes químics per a la detecció d'un nombre suficient de compostos per detectar possibles defectes de florit-humitat. A més, el fet que la majoria dels compostos d'interès tingui un origen microbià ha fet necessari complementar les anàlisis químiques amb mètodes de detecció i aïllament de microorganismes susceptibles de produir-los.

Per aquest motiu, el present estudi respon a un objectiu principal que és:

Contribuir a l'ampliació del coneixement sobre els compostos orgànics volàtils presents en el suro i microorganismes que els produeixen.

Dins d'aquesta línia d'investigació es plantegen els següents objectius més concrets:

1. Desenvolupar i avaluar una metodologia basada en la microextracció en fase sòlida (SPME) i la cromatografia de gasos per a l'anàlisi conjunta de compostos volàtils responsables del gust de florit-humitat en macerats de suro.

2. Aplicar tècniques de *fingerprinting* molecular a la identificació de microorganismes, en mostres de suro de diferent naturalesa i a diferents fases del procés de manufactura.

3. Avaluar la capacitat de producció de defectes sensorials per microorganismes aïllats de suro utilitzant tècniques olfactomètriques.

3. PUBLICACIONS

3.1 Screening of musty-earthy compounds from tainted cork using water-based soaks followed by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry

Chantal Prat, Lluís Bañeras, Enriqueta Anticó

Eur Food Res Technol. **2008** *227*, 1085–1090

C. Prat, L. Bañeras, E. Anticó. “Screening of musty-earthy compounds from tainted cork using water-based soaks followed by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry”. *European food research and technology*. Vol. 227, nº 4 (aug. 2008) : p. 1085-1090

http://dx.doi.org/10.1007/s00217-008-0823-0

Institut d’Ecologia Aquàtica, Universitat de Girona, 17071, Girona, Spain
Departament de Química, Universitat de Girona, 17071, Girona, Spain

Received: 4 October 2007 Revised: 17 December 2007 Accepted: 9 January 2008 Published online: 12 February 2008.

Abstract

Compounds responsible for musty-earthy off-flavours in cork, namely 2-methylisoborneol (MIB), geosmin (GSM), 2,4,6-trichloroanisole (TCA) and 2-methoxy-3-isopropylpyrazine (IPMP), were determined from tainted cork using water-based soaks followed by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry (HS-SPME–GC–MS). The influence of the fibre coating used and of the extraction time and temperature were investigated for the joint analysis of MIB, GSM, TCA and IPMP. Considering the obtained results, an extraction time of 30 min at a temperature of 50 °C were fixed as experimental conditions, using a divinylbenzene/carboxen-polydimethylsiloxane/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) fibre. Quality parameters of the chromatographic method were obtained and good recoveries (117–128%) were found in spiked aqueous cork macerates. Using the same experimental conditions, the presence of guaiacol, 2,3,4,6-tetrachloroanisole (TeCA), pentachloroanisole (PCA), 2,4,6-tribromoanisole (TBA) and 2-methoxy-3,5-dimethylpyrazine (MDMP) could also be evaluated in a single chromatogram. From all the compounds analyzed in tainted samples, TCA and guaiacol were the only contaminants present and only TCA concentrations were found above its perception threshold in water.

Keywords: Cork - Musty-earthy taint - Solid phase microextraction

3.2 Molecular Fingerprinting by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Reveals Differences in the Levels of Microbial Diversity for Musty-Earthy Tainted Corks

Chantal Prat, Olaya Ruiz-Rueda, Rosalia Trias, Enriqueta Anticó, Dimitra Capone, Mark Sefton, Lluís Bañeras

Appl. Environ. Microbiol. **2009**, *75 (7),* 1922–1931

C. Prat, O. Ruiz-Rueda, R. Trias, E. Anticó, D. Capone, M. Sefton, L. Bañeras. "Molecular Fingerprinting by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Reveals Differences in the Levels of Microbial Diversity for Musty-Earthy Tainted Corks". *Applied and environmental microbiology*. Vol. 75, nº 7 (Apr. 2009) : 1922-1931

http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02758-08

Institut d'Ecologia Aquàtica, Universitat de Girona, 17071, Girona, Spain
Departament de Química, Universitat de Girona, 17071, Girona, Spain

Received 4 December 2008; Accepted 23 January 2009

Abstract

The microbial community structure of cork with marked musty-earthy aromas was analyzed using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. Cork stoppers and discs were used for DNA extraction and were analyzed by using selective primers for bacteria and fungi. Stoppers clearly differed from discs harboring a different fungal community. Moreover, musty-earthy samples of both types were shown to have a specific microbiota. The fungi *Penicillium glabrum* and *Neurospora* spp. were present in all samples and were assumed to make only a small contribution to off-odor development. In contrast, *Penicillium islandicum* and *Penicillium variabile* were found almost exclusively in 2,4,6-trichloroanisole (TCA) tainted discs. Conversely, *Rhodotorula minuta* and *Rhodotorula sloofiae* were most common in cork stoppers, where only small amounts of TCA were detected. Alpha- and gammaproteobacteria were the most commonly found bacteria in either control or tainted cork stoppers. Specific *Pseudomonas* and *Actinobacteria* were detected in stoppers with low amounts of TCA and 2-methoxy-3,5-dimethylpyrazine. These results are discussed in terms of biological degradation of taint compounds by specific microorganisms. Reliable and straightforward microbial identification methods based on a molecular approach provided useful data to determine and evaluate the risk of taint formation in cork.

3.3 Off-odor compounds produced in cork by isolated bacteria and fungi: a gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-olfactometry study

Prat C., Trias R., Culleré L., Escudero A., Anticó E., Bañeras L.

J. Agric. Food Chem., ***2009****,* 57 *(16), 7473–7479*

C. Prat, R. Trias, L. Culleré, A. Escudero, E. Anticó, L. Bañeras. "Off-Odor Compounds Produced in Cork by Isolated Bacteria and Fungi: A Gas Chromatography−Mass Spectrometry and Gas Chromatography−Olfactometry Study". *Journal of agricultural and food chemistry*. Vol. 57 (Jul. 2009) : p. 7473–7479.

http://dx.doi.org/10.1021/jf900723s

Institut d'Ecologia Aquàtica, Universitat de Girona, 17071, Girona, Spain
Departament de Química, Universitat de Girona, 17071, Girona, Spain

Abstract

The risk of development of specific olfactory profiles in cork was evaluated after inoculation of cork granules and agglomerated and natural cork stoppers with isolated bacteria and fungi. The highest incidence of off-odor development was found in assays when fungi were inoculated. Cork granules with musty-earthy, musty-earthy-TCA, and vegetative deviations were inspected by gas chromatography−olfactometry (GC-O) and gas chromatography−mass spectrometry (GC-MS). Sixteen odor zones were clearly recognized in the GC-O analyses. Among these, octanal, 2-methoxy-3,5-dimethylpyrazine (MDMP), *Z*-2-nonenal, 2-methylisoborneol, 2,4,6-trichloroanisole (TCA), geosmin, and guaiacol were the most significant odorants and helped in the discrimination of sensory deviations. Only TCA and guaiacol were detected above their respective detection limits by HS-SPME-GC-MS. The fungi *Cryptococcus* sp. isolate F020, *Rhodotorula* sp. isolate F025, *Penicillium glabrum* isolate F001, and *Pennicillium variabile* F003A and the bacterium *Pseudomonas jessenii* isolate A1 were found to produce TCA to a greater extent. Additionally, 13 of 38 isolated microorganisms (2 bacteria and 11 fungi) proved able to produce unpleasant musty-earthy or vegetative odors that were not related to a significant TCA accumulation.

3.4 Multivariate analysis of volatile compounds detected by headspace solid-phase microextraction: a tool for sensory classification of cork stoppers

Chantal Prat, Emili Besalú, Lluís Bañeras, Enriqueta Anticó

Food Chemistry (enviat)

Multivariate analysis of volatile compounds detected by headspace solid-phase microextraction: a tool for sensory classification of cork stoppers

Chantal Prat[1,2], Emili Besalú[3], Lluís Bañeras[2] and Enriqueta Anticó[1*]

[1]Dept. of Chemistry, University of Girona

[2]Molecular Microbial Ecology Group (Institute of Aquatic Ecology), University of Girona

[3]Institute of Computational Chemistry, University of Girona

* Corresponding author: Dept. of Chemistry, University of Girona, Campus Montilivi s/n, E-17071 Girona. Tel: 972 418276. Fax: 972 418150. E-mail: enriqueta.antico@udg.edu

ABSTRACT

The volatile fraction of aqueous cork macerates of tainted and non-tainted agglomerate cork stoppers was analysed by headspace solid phase microextraction (HS-SPME). Twenty compounds containing terpenoids, aliphatic alcohols, lignin related compounds and others were selected and analysed in individual corks. Cork stoppers were previously classified in six different classes according to sensory descriptions including, 2,4,6-trichloroanisole taint and other frequent, non-characteristic odours found in cork. A multivariate analysis of the chromatographic data of twenty selected chemical compounds using linear discriminant analysis models helped in the differentiation of the *a priori* made groups. The discriminant model selected five compounds as the best combination. Selected compounds appear in the model in the following order; 2,4,6 TCA, fenchyl alcohol, 1-octen-3-ol, benzyl alcohol and benzothiazole. Unfortunately, not all six *a priori* differentiated sensory classes were clearly discriminated in the model, probably indicating that no measurable differences exist in the chromatographic data for some categories. The predictive analyses of a refined model in which two sensory classes were fused together resulted in a good classification. Prediction rates of control (non-tainted), TCA, musty-earthy-vegetative, vegetative and chemical descriptions were 100, 100, 85, 67.3 and 100%, respectively, when the modified model was used. The multivariate analysis of chromatographic data will help in the classification of stoppers and provide a perfect complement to sensory analyses.

Key words: tainted cork, multivariate analysis, HS-SPME, sensory classification, musty-earthy, TCA

INTRODUCTION

Cork is a natural product with physical properties, such as impermeability to liquids and air, compressibility, resilience and chemical inertness, that are particularly well-suited to preserve bottled wine. As a material to be employed in contact with wine, the cork industry has implemented different tests aimed at avoiding potential risks to consumer health and ensuring the protection of wine quality. For this purpose different regulations have been established to check for the absence of toxic residues in cork stoppers as well as substances used during the fabrication process that can cause wine oxidation (Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR), 2004b). Microbial controls have also been performed routinely to prevent different wine alterations. In addition, cork stoppers must ensure that the sensory attributes of a particular wine are not negatively modified and for this reason it is crucial to carry out a sensory evaluation of the product, which is regularly done in the industry by trained personnel (Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR), 2004a).

A large number of volatile compounds have been reported in cork, for example aliphatic alcohols, aldehydes and ketones, alkanes, aromatic compounds, cycloalkanes, furans, terpenoids and chlorinated or lignin-related compounds (Rocha, Delgadillo & Ferrer Correia, 1996). The origin of these compounds is extremely diverse, but microorganisms play a significant role. The degradation of fatty acids may produce aldehydes and their corresponding alcohols, ketones, alkanes and alkenes. The presence of cycloalkanes correlates well with microbiological activity but its formation mechanism is not well understood. Terpenoids, which may exist as a highly complex mixture, can also be related to the presence of certain moulds, for example Armillaria mellea (Rocha, Delgadillo & Ferrer Correia, 1996). Phenols, guaiacol, benzaldehyde, vanillin, benzyl alcohol and methoxylated phenol derivatives are considered to be lignin-related compounds and can be produced thermally or by the microbial degradation of phenolic acids and lignin (Belitz & Grosch, 1987). The formation of chloroanisoles has been also documented as a microbial process (Allard, Remberger & Neilson, 1987, Álvarez-

Rodríguez et al., 2002). All these compounds contribute in different manners to the global volatile signature of cork and the aroma perception.

All the odour-active molecules mentioned above are generally identified and analysed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) techniques. However, in most cases, a previous extraction and pre-concentration step is necessary, which is usually carried out by dynamic headspace, purge and trap or simultaneous distillation-extraction techniques. Solid-phase microextraction (SPME) can be regarded as an alternative technique and has been used to characterise the volatile fraction of food matrices, for example in cheese (Chin, Bernhard & Rosenberg, 1996), beer (Saison, De Schutter, Delvaux & Delvaux, 2008, Silva, Augusto & Poppi, 2008) and wines (Demyttenaere, Dagher, Sandra, Kallithraka, Verhe & De Kimpe, 2003, Whiton & Zoecklein, 2000). SPME has the advantage, when compared with other extraction and pre-concentration techniques, that it is solvent-free and can be easily automated (Pawliszyn). The application of HS-SPME coupled to GC-MS for the determination of selected off-odour compounds related to cork has been described previously (Insa, Besalu, Iglesias, Salvado & Antico, 2006, Juanola et al., 2004, Prat, Anticó & Bañeras, 2008).

Of particular interest to the cork industry is the identification of chemicals that can be assigned to a particular sensory deviation. This has only been unambiguously accomplished for 2,4,6-trichloroanisole (TCA), which has prompted the generalised use of SPME-GC as a routine technique in cork producing companies (Buser, Zanier & Tanner, 1982). However, there is a significant incidence of many other off-odours in cork, i.e. musty or mouldy, vegetative and chemical, which can only be determined after sensory classification by experienced panellists. The use of HS-SPME GC/MS is not the first analytical choice when research is aimed at defining representative molecules in new and poorly studied taints. Other methods such as GC-olfactometry are used instead (Culleré, Cacho & Ferreira, 2009, Culleré, Escudero, Pérez-Trujillo, Cacho & Ferreira, 2008). In a recent work, we have used GC-O analyses to characterise musty-earthy taints not related

with TCA in cork and to relate off-odour formation to the inoculation of selected bacterial and fungal isolates (Prat, Trias, Culleré, Escudero, Anticó & Bañeras, In press).

Multivariate analyses of highly complex sets of chromatographic data may help determine variables significantly contributing to unpleasant aromas and can be implemented as a sample classification tool. There are only a few examples in which head space extraction coupled to MS and statistical analysis have been used to classify wines and corks of different geographical origins (Boudaoud & Eveleigh, 2003, Martí, Busto & Guasch, 2004). Additionally, neural network maps constructed from chromatographic data were used for exploratory analyses of beer (Silva, Augusto & Poppi, 2008) and the detection of bacterial metabolites in fresh vegetables (Siripatrawan & Harte, 2007).

In the present work, we focus on the application of multivariate analysis of complex chromatographic data obtained by HS-SPME-GC/MS from aqueous cork macerates. Our main objective was to provide a useful and predictive tool to differentiate between unpleasant aromas that may be detected in cork and cannot be unambiguously attributed to a single chemical compound. The obtained results are discussed in terms of a complement to sensory analyses, which are easily implemented in the cork producing companies, but are affected by external factors that may lead to a rather subjective classification of cork properties.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

All the reference chemical compounds used in this study were obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain), Fluka (Madrid, Spain) and Riedel-de-Haën (Seelze, Germany). NaCl (99.8%) and d_5-2,4,6-trichloroanisole (99.5%, used as an internal standard) were purchased from Riedel-de-Haën. Separated stock solutions were prepared in HPLC-grade methanol (Carlo Erba Instruments, Milan, Italy) at a concentration level of 1 mg L^{-1}. d_5-TCA was used as an internal standard (IS) at a concentration of 47 ng L^{-1} in the working solutions. High purity water was taken from a Milli-Q plus water system.

Cork samples and sensory evaluation

Ready-to-use twin top agglomerated cork stoppers for sparkling wine (9 g on average) were used throughout this study. All cork stoppers (230 units) were generously provided by TESA (Palafrugell, Spain) and were selected from a batch of cork stoppers previously rejected in the industry due to the high incidence of non-characteristic aromas (34% of stoppers). Sensory evaluation was performed by three independent judges using cork macerates obtained after soaking single stoppers in 50 mL of water for 24 h without agitation at room temperature (Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR), 2004a). In a first training session, the judges generated descriptive terms for the sensory deviations present in the cork macerates. In the second and third sessions, different macerates were presented and the terms were discussed. Through these discussions, five non-characteristic aromas were defined and used for the classification of cork samples: musty-earthy (ME), musty-earthy-TCA (ME-TCA), musty-earthy-vegetative (ME-VEG), vegetative (VEG) and chemical (CHEM). After the training periods, the macerates were evaluated. Among all defined classes, ME-VEG and VEG where the ones that generated most of the disagreement between the different judges.

Sample preparation and headspace solid-phase microextraction

SPME experiments were performed with a manual fibre holder with a commercially available fibre coating: 50/30 μm divinylbenzene/carboxen/ polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS). The fibre holder and coatings were supplied by Supelco. Before use, each fibre was conditioned according to the supplier's instructions.

In order to assess the possible effect of the extraction procedure in the determination of cork volatiles, three different sample preparations were tested using homogenised cork granules as a model sample. Specifically, the following preparations were used: 1) the direct extraction of 0.4 g of the solid, 2) the extraction of the solid after the addition of 2 mL of 4 M NaCl aqueous solution and 3) the extraction of 5 mL of aqueous cork macerates. The cork macerates were previously obtained from the

suspension of 8 g of cork granules in 100 mL of water for 24 h at room temperature without agitation.

Fifteen mL screw-cap glass vials were used for solid and aqueous samples. Once the sample had been introduced, (preparation modes 1 and 2), the vials were closed and clamped in a water-thermostated bath at the selected temperature. For the extraction of cork macerates, 1.2 g of NaCl were added to the 5 mL solution to favour the concentration of non-polar compounds in the headspace of the vial. These samples were stirred (500 rpm) using a PTFE-coated stir bar and a magnetic stirrer (Variomag®). Dry cork samples prepared according to mode 1 were extracted at 50, 60 and 70ºC. Samples prepared according to modes 2 and 3 were extracted at 50 ºC.

The fibre was exposed to the headspace generated in the sample vial for 30 minutes and under defined temperature conditions. It was then removed from the vial and inserted into the injection port of the GC for thermal desorption for 5 minutes.

In all cases, the experimental conditions were adjusted so that the same amount of cork or an equivalent volume of cork macerate was extracted. Blanks were obtained from the analysis of a 4 M NaCl solution using the method described for the aqueous cork macerate. This analysis was done to depict possible artefacts arising from the water used to prepare the solutions.

Gas chromatography–mass spectrometry

Gas chromatographic analyses were performed with a Trace GC 2000 series gas chromatograph coupled to a PolarisQ ion trap mass spectrometer detector (Thermo, Milan, Italy), operating in the electron impact (EI) mode at 70 eV. A SGE BPX-5 capillary column (30 m × 0.25 mm i.d.; film thickness, 0.25 μm) was used. Helium was the carrier gas at 1 mL/min. A split/splitless injector was used in the splitless injection mode for 5 min with an injector temperature of 250 ºC. The oven temperature programme was 5 min at 40 ºC, then increasing by 8 ºC/min up to 100 ºC, then by 5 ºC/min up to 200 ºC, then by 15 ºC/min up to 270 ºC and finally 5 min at 270 ºC. The ion source was set at 225 ºC and

the transfer line was held at 270 ºC. In the full-scan acquisition mode, electron ionisation mass spectra in two ranges, m/z 60-170 and 100-350, were recorded. Ion extraction chromatograms were obtained from the full-scan acquisition mode using the selected ions presented in Table 1. The mass spectra data were compared with reference spectra (Wiley7 database) and with pure standards. The chromatographic data were analysed using Xcalibur 1.4 software. Chromatographic peaks were manually integrated and normalised as peak area ratios with respect to a fixed concentration of the IS (measured at m/z 215 and 217). Peak area ratios were used as independent variables for multivariate data analyses.

Table 1. Target compounds and m/z ratios used for identification and quantification in SPME-GC/MS analyses.

TARGET COMPOUNDS			
Compound	**quantification m/z**	**Compound**	**quantification m/z**
Terpenoids		**Aliphatic Alcohols**	
linalool	80+83	1-octen-3-ol	72
borneol	95	1-octanol	69+70+83
β-terpineol	136		
limonene	95	**Lignin related compounds**	
α-terpinolene	93+136	guaiacol	81+109+124
citronellal	95	1,2-dimethoxybenzene	95
camphor	95	benzyl alcohol	77+79+108
1,8-cineole	81		
camphene	79+93+121	**Chlorinated compounds**	
geraniol	123	TCA	210+212
fenchyl alcohol	81		
isomenthylacetate	95	**Other compounds**	
		benzothiazole	108+135

Statistical analyses

Obtained values of the relative areas of the 20 compounds were analysed for normal distribution. In general, the distribution of most selected variables was not gaussian and extreme values were reproduced in box plots. The systematic transformation of every variable to its square root proved to be useful to smooth these ranges of variation (results not shown), and transformed variables were used for the subsequent data treatment.

Several multivariate techniques were considered to analyse the experimental data. Principal component analysis (PCA) and factor analysis were used as a way to reduce the number of descriptor variables. These calculations were performed using Minitab software (MINITAB, Minitab Inc., State College, PA, 2004).

Stepwise linear discriminant analysis (LDA) was applied as a classification method among user-defined categories (sensory classes) using SPME-GC generated data and the V-Parvus programme module STEPLDA (M. Forina, Lanteri, Armanino, Cerrato-Oliveros & Casolino, 2004). LDA is a supervised pattern recognition method that searches for discriminant functions defined by a few selected variables. The mathematical criteria followed consists of maximizing both, the separation among user-defined categories and the between-class relative to the within-class variance. Each discriminant function is defined as a new canonical variable and is expressed as a linear combination of the originally selected variables. If c categories are defined along the data, only $c-1$ independent canonical variables can be obtained. The method performs a variable selection according to a forward stepwise procedure leading to the optimisation of the discrimination (James, 1985). Specifically, an *F*-to-enter *F*-to-remove criterion was applied to Wilks' lambda variable analysis in such a manner that the selected variables were those that maximised the decrease of lambda when evaluating the influence of each new variable. This first step of the analysis was used for the selection of variables significantly contributing to group discrimination. In a second step, the corresponding model expressed in terms of canonical variables was also obtained.

The obtained model was validated via a leave-one-out cross-validation procedure (Wold & Eriksson, 1995). This procedure is very useful for checking the model's performance against the risk of bad classification predictions in the future. The quality of the discriminant model was evaluated based on the ability of total classification rate in prediction (A) and the distinct category rates (expressed in percentage, P_c). Mathematical expressions for A and P_c are as follows:

$$A = \frac{\sum_c n_c}{N}$$

$$P_c = 100 \frac{n_c}{N_c}.$$

where, n_c is the number of correct predictions for a given category *c*, N_c is the number of classifications for category *c* and *N* is the total number of predictions. It is worth noting that *A* and P_c parameters also apply for training purposes.

RESULTS AND DISCUSSION

Sensory classification of cork samples

A total number of 230 cork stoppers for sparkling wine were analysed individually to select for non-characteristic aromas. A sufficient number of representatives of all selected sensory classes – musty-earthy (ME), musty-earthy-TCA (ME-TCA), musty-earthy-vegetative (ME-VEG), vegetative (VEG), and chemical (CHEM) – were obtained after the inspection of corks. Among all the analysed samples, 78 stoppers exhibited unpleasant aromas of different types (Table 2). Most common deviations were distributed among musty-earthy (47.4% of tainted stoppers) and chemical notes (42.3%). Within the first class, sensory evaluation allowed the discrimination of stoppers having a strong TCA note (10.3%) from other classes having more complex aromas. Among those, corks exhibiting a musty-earthy deviation characterised by the presence of a green olive note were the most common (19.2%). Chemical notes were mostly detected at high intensities (5 in a scale of 0-5) and all coincided with pungent, sulphur and mud descriptors.

Although not all defined sensory classes and intensities found would have led to the classification of the analysed corks as rejected samples if the regular industry practices apply, we have used them as such since they were clearly distinguishable from control cork stoppers. As an example, vegetative notes (VEG) are usually not characterised as a critical deviation which will affect wine properties. Moreover, some unpleasant aromas were predominantly detected at relatively low intensities, i.e. musty-

earthy notes, which can escape detection by non-experienced panellists. Since the objective of our work was to provide reliable methods for cork classification not exclusively dependent on sensory analyses, all defined classes were considered despite the aroma and intensity found.

Table 2. Description and intensities (on a scale of 5) of the common sensory deviations found in the analysed cork samples. Relative frequencies (%) of the detected deviations are indicated as percentages (n=78). Abbreviations used for class designation in the text appear in parenthesis.

Sensory deviation	**Main odour notes**	**Intensity (1-5)**	**Frequency (%)**
TCA (ME-TCA)	Musty, earthy, humid, TCA	5	3.8
		4	5.1
		3	1.3
Musty-Earthy (ME)	Musty, moldy, earthy, humid.	5	5.1
		4	2.6
		3	2.6
		2	7.7
Musty-Earthy-Vegetative (ME-VEG)	Musty, humid, vegetative, green olive	5	0.0
		4	19.2
Vegetative (VEG)	Vegetative, green	5	2.6
		4	5.1
		3	2.6
Chemical (CHEM)	Humid, pungent, mud, sulphur, wet cardboard	5	26.9
		4	9.0
		3	3.8
		2	2.6

Selection of sample preparation methodology for HS-SPME chromatographic analysis

The extraction of volatile organic compounds from solid samples with the HS-SPME technique is not straightforward. The degree of partitioning of volatiles between a solid and the headspace is low and the addition of water or some polar solvent

to the sample to promote the release of volatiles is a regular practice (Zhang & Pawliszyn, 1995). Additionally, the preparation of standards for calibration purposes in the case of solids is not easy due to the difficulties in reproducing the interaction between the analytes and the matrix.

For these reasons, the use of solid cork and aqueous cork macerates were tested as sample preparation methods for HS-SPME. In order to compare the various sample treatments performed for all the different analytes, dry samples at an extraction temperature of 50ºC were set as a reference and given a relative value of 1 for all detected compounds. Values obtained for the other treatments were rescaled by dividing actual peak areas by those found in the reference treatment. The responses obtained in the GC were compared for selected compounds (Figure 1).

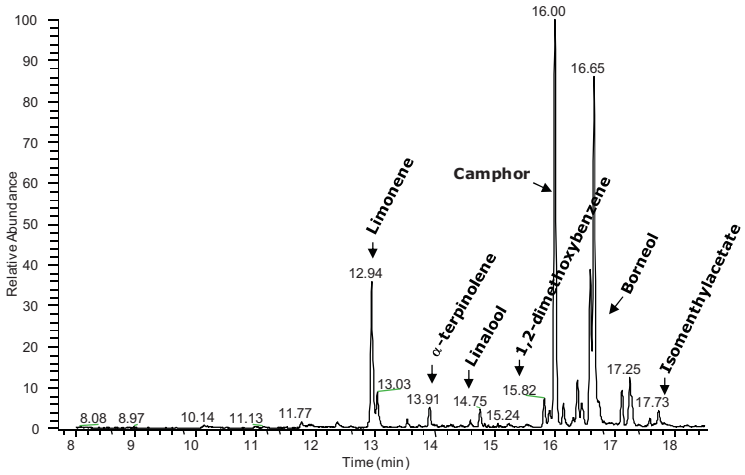

Figure 1. Example chromatogram of an aqueous cork macerate obtained in scan mode (m/z= 95). Selected peaks included in Table 1 and visible in the chromatogram are highlighted.

The variation of the extraction temperature (from 50 to 70ºC) directly affected the extraction of most of the screened compounds when dry cork samples were used. Maximum extraction efficiencies were found at 70ºC and accounted for 2- to 4-fold increase. Terpinolene was the only compound that did not exhibit any increase in the extraction efficiency due to changes in the temperature. The addition of 2 ml of NaCl

solution increased the extraction capacity for guaiacol, veratrole and citronellol and resulted in a 2- to 10-fold increase even at low temperatures. On the contrary, the extraction of other molecules, such as TCA, limonene and fenchyl alcohol, exhibited a much lower variation (1.6- to 1.7-fold increase) in the extraction efficiency.

The use of cork macerates resulting from the incubation of cork for 24 h at ambient temperature resulted in the highest extraction efficiencies for all compounds except for 2,4,6-trichloroanisole. This particular behaviour may be explained by taking into account the low solubility of TCA in the solvent and also its strong adsorption in cork as demonstrated in other studies (Capone, Skouroumounis, Barker, McLean, Pollnitz & Sefton, 1999). As a compromise, we have decided to use cork macerates for the analyses of cork stoppers for two reasons. First, this method is similar to that used for sensory evaluation, which will help in the comparison of the results. Second, the method to evaluate the amount of releasable TCA in cork macerates is sensitive enough to ensure a good quantification even at low concentrations (Prat, Anticó & Bañeras, 2008).

Exploratory analyses of cork volatiles detected by HS-SPME

The macerates of 63 samples exhibiting sensory deviations were analysed by HS-SPME-GC/MS and compared with the aqueous macerates of 15 cork stoppers exhibiting no recognisable off-odour and selected from the same batch. A DVB/CAR/PDMS coating was selected since it presents a wide range capacity of sorbing compounds with different physicochemical properties even though the number of organic compounds detected is lower when compared with other exhaustive extraction techniques (Mazzoleni, Caldentey, Careri, Mangia & Colagrande, 1994, Rocha, Delgadillo & Ferrer Correia, 1996). Moreover, the full-scan acquisition mode combined with the ion extraction mode, usually performed by selecting characteristic target ions from the analytes under study, has allowed the detection of a sufficient number of extracted volatiles (Figure 2).

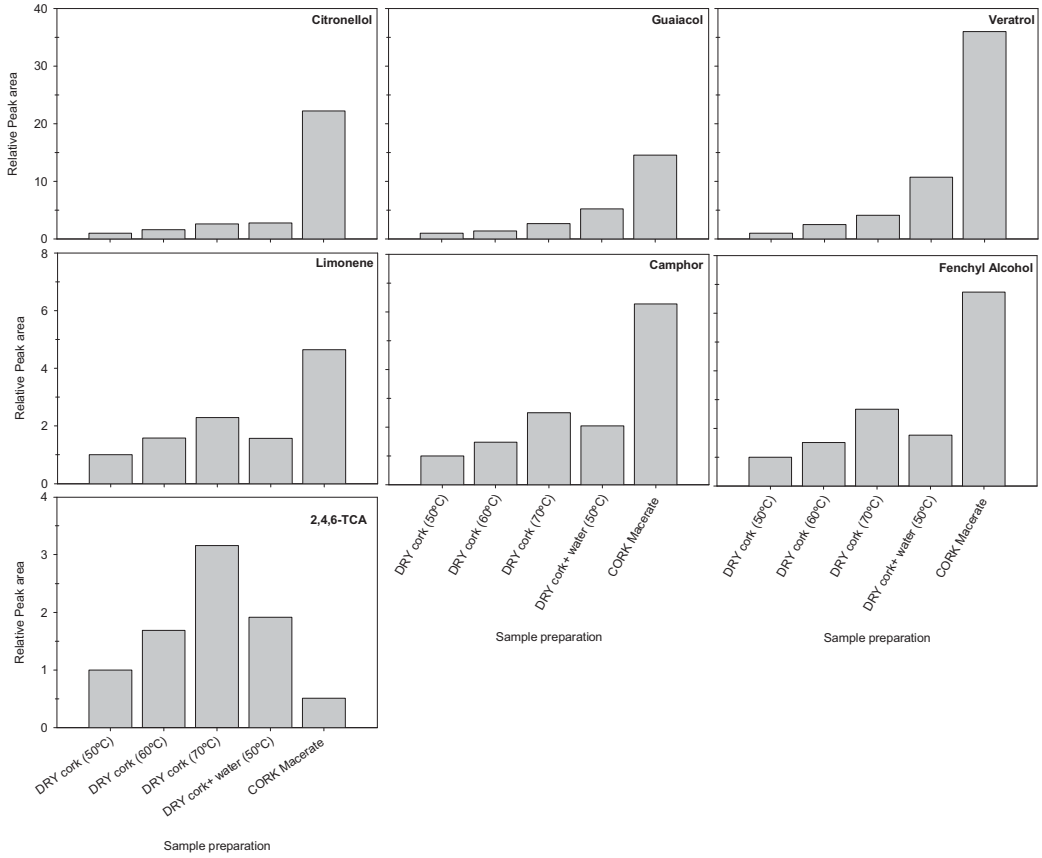

Figure 2. Extraction capacity of some of the different compounds analysed as a function of the sample preparation procedure. Peak areas of every single component were normalised to the extraction obtained with dry cork at 50ºC for comparison.

Using this method we ended up with a list of 20 compounds, most of them belonging to the chemical family of terpenoids (Table 1). The terpenoids are a large and diverse class of naturally-occurring organic chemicals, which are used extensively for their aromatic qualities. Additionally, lignin related compounds, including guaiacol, 1,2-dimethoxybenzene (veratrole) and benzyl alcohol, have also been found in cork macerates. The presence of benzothiazole as a constituent of the volatile fraction of cork was also documented (Rocha, Delgadillo & Ferrer Correia, 1996) and this molecule was included as a target compound in the GC/MS analysis.

Screening of significant variables

Principal component analysis (PCA) was applied to HS-SPME chromatographic data as a first exploratory method to define the relative importance of some variables in

relation to others. Unfortunately, the level of data simplification by means of variable selection was quite low when all the defined sensory classes (control samples and sensory deviations) were selected. From all defined groups, ME-TCA was the only one that could be clearly differentiated from the rest.

LDA was used as an alternative to allow a sample classification in accordance with sensory descriptions and human classification, using a reduced number of variables. Initially the six disjoint groups were considered and stepwise LDA (SLDA) was performed on peak area ratios to get a good set of optimal variables for the differentiation between sample classes. Five variables were selected, namely TCA, fenchyl alcohol, 1-octen-3-ol, benzyl alcohol and benzothiazole. As expected, the selected variables correlate poorly among themselves (absolute values of the *r* Pearson coefficient ranging from 0.04 to 0.2) except between benzothiazole and TCA (r=0.46). The discrimination between most of the defined sensory classes was clearly seen in a biplot of the newly defined canonical variables CV-1 and CV-2 (Figure 3). The ME-TCA group clearly remained differentiated from the others, as seen by the relatively low scores in CV-1.

Interestingly, all compounds contributing to class differentiation have been previously detected in cork and have been described in greater amounts in samples colonised by microorganisms (Pérez-Coello, Sanz & Cabezudo, 1998, Rocha, Delgadillo & Ferrer Correia, 1996). Although no clear relationship exists between the relative concentration of these compounds and the identification of a defined sensory deviation, all of them appear exclusively in tainted samples colonised by either the fungus *Armillaria mellea* or other unidentified moulds except benzyl alcohol, which was also found in control samples. Moreover, 1-octen-3-ol and fenchyl alcohol have been detected at concentrations ranging from 2 to 30 mg/L in tainted apple juice samples with marked earthy, humid and mushroom aromas among other descriptors (Siegmund & Pollinger-Zierler, 2006).

Predictive capacity of the model

Apart from providing a good discrimination between sample types, LDA models can be used for prediction purposes. In this sense, the prediction capacity of the model was evaluated by the leave-one-out cross-validation procedure. In the initial LDA analysis, no clear difference could be seen between the sensory classes defined as ME, ME-VEG and CHEM (Figure 3). This feature is reinforced by the fact that rather lower predictive rates were calculated for these three classes. The achieved ability when all six defined classes were used separately was 74.0 %. In fact, the category rates for leave-one-out predictions were 100%, 42.9%, 100%, 66.7%, 80.0% and 73.3 % for Control, ME, ME-TCA, CHEM, VEG and ME-VEG, respectively.

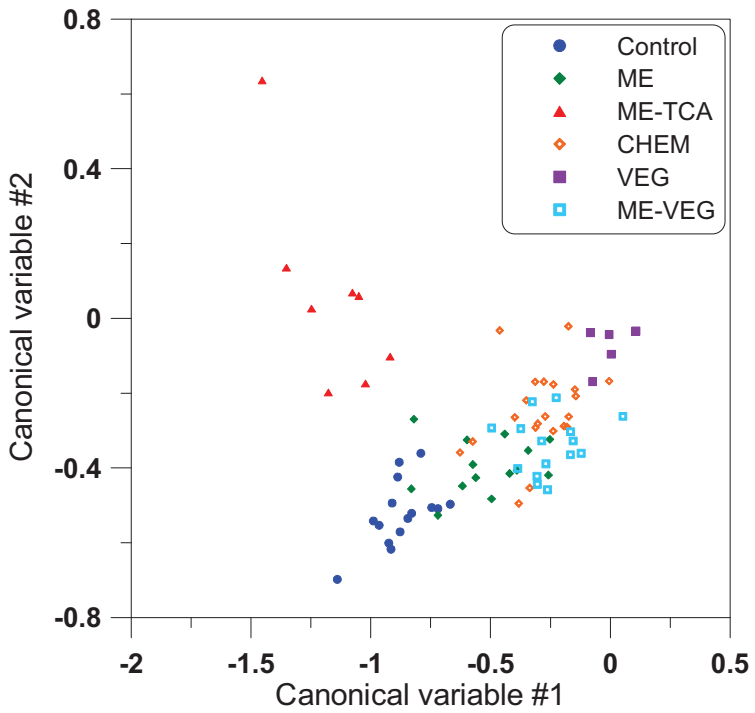

Figure 3. Scatter plot of canonical variables CV-1 and CV-2 for cork samples after performing stepwise LDA.

In order to refine the predictive capacity of the model, the ME and ME-VEG classes were fused into a single sensory class, since they shared some of the sensory descriptors provided. With this new approach, the programme selected the same five variables and the preferential selection order (Table 3).

Table 3. Selected variables by V-Parvus STEPLDA module and results of the defined statistics Wilk's lambda used for variable selection. Every variable had been previously transformed into its square root.

Variable number	Variable	*F* value to enter	Wilks' lambda	Wilks' lambda decrease
1	TCA	46.0	0.284	0.716
2	Fenchyl alcohol	16.7	0.147	0.137
3	1-octen-3-ol	15.9	0.078	0.069
4	Benzyl alcohol	17.5	0.039	0.039
5	Benzothiazole	9.1	0.025	0.013

The bidimensional distribution of cork samples can be explained in terms of two canonical variables. The coefficients attached respectively to the five compounds given in Table 3 were -0.617, -0.535, 0.227, 0.462 and -0.271 for CV-1, and 0.390,-0.887,0.162,0.177,-0.053 for CV-2. The first coefficient of CV-1 was the greatest one in the vector and corresponded to TCA. Other relevant contributions were attached to fenchyl alcohol and benzyl alcohol. On the other hand, CV-2 has an even stronger contribution from fenchyl alcohol. Representing the difference between canonical variables 1 and 3 and that of canonical variables 2 and 4 reveals the interclass separations achieved in this new model (Figure 4). Qualitatively, in this representation four categories are sequentially disposed forming a quadrangular distribution of the following classes ME-TCA, ME + ME-VEG, CHEM, and Control. The fifth category, VEG, is distributed in the centre of the plot. The difference between canonical variables 1 and 3 has a strong benzyl alcohol component whereas the difference between the second and fourth canonical ones has a very important component related again to fenchyl alcohol.

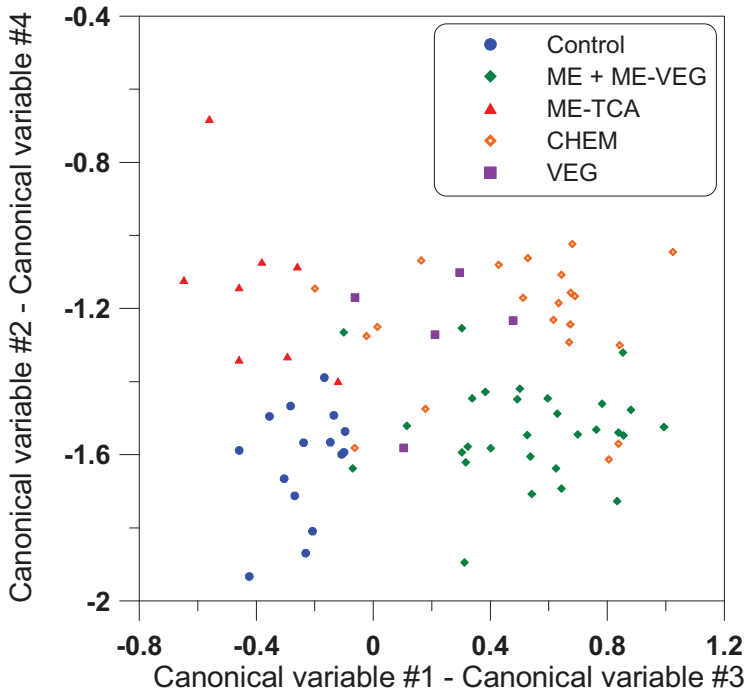

Figure 4. Plot of the differences between scores of the canonical variables CV-1 minus CV-3 and CV-2 minus CV-4 obtained from stepwise LDA in the refined model. Sensory classes refer to: Control- non tainted stoppers, ME-TCA- TCA tainted, ME+ME-VEG- fused category between Musty-Earthy and Musty-Earthy-Vegetative, VEG- Vegetative, CHEM- Chemical.

The performance of the refined model was expressed in terms of the prediction category rates (P_c) and total ability (A) of the model measured both as cross-validation and leave-one-out prediction procedures. The classes Control and ME-TCA were always correctly predicted (100%) and significant increments were recorded for the merged sensory class ME+ME-VEG (Table 4). It should be noted that although the sample distribution in the defined canonical space obeys changes in the concentration of defined volatile compounds in the cork macerate, no direct assignation of these compounds to a specific off-odour can be made except for ME-TCA. In fact, ME and ME-VEG off-odours had been previously screened by GC-O analysis both in natural cork samples and in cork granules previously incubated by selected bacteria and fungi with low coincidences in significant odour active molecules (Prat et al. 2009 In press). Key odorants defined in the sensorial classes were 2-methoxy-3,5-dimethylpyrazine (MDMP), 2-methylisoborneol and geosmin in the case of ME and MDMP combined with octanal for ME-VEG. Although key olfactory signatures were obtained for these taints, they appeared to be fairly complex with no single molecule attributable to the development of the unpleasant odour.

Table 4. Percentages of correctly classified samples of the refined LDA model when five classes were considered (see text). Classes ME and ME-VEG have been fused into a single one. The number of correct/total predictions is given in brackets.

Sensory Class	**P_c Classification (%)**	**Leave-one-out prediction (%)**
Control	100 (1170/1170)	100 (15/15)
ME + ME-VEG	84.6 (1914/2262)	75.9 (22/29)
ME-TCA	100 (624/624)	100 (8/8)
VEG	67.3 (1102/1638)	66.7 (14/21)
CHEM	100 (390/390)	80 (4/5)
Ability (*A*)	85.5 (5200/6084)	80.8 (63/78)

In conclusion, a new method based on a multivariate discriminant model of HS-SPME-GC-MS data of volatile compounds is proposed to help in the sensory classification of ready-to-use agglomerated cork stoppers for sparkling wine. The proposed method uses the same extraction and quantification method as for 2,4,6-trichloroanisole determination, but expands the analysis of volatile compounds to twenty additional compounds. We have shown that non-typical TCA odours commonly found in cork by sensory inspections can be defined from a detailed analysis of chromatographic data. The linear discriminant analysis (LDA) of the initial set of twenty compounds resulted in a final set of five molecules, TCA, fenchyl alcohol, 1-octen-3-ol, benzyl alcohol, and benzothiazole, to effectively separate between five *a priori* defined sensory classes. The specified compounds were easily distinguished and quantified in routine GC analyses of cork macerates in the industry. The use of the five selected compounds effectively discriminated non-tainted corks at a 100% level based on the outcome of a predictive leave-one-out cross validation procedure of the final model. Different sensory descriptions including TCA-taint, musty-earthy and chemical notes were also effectively discriminated at values between 84 and 100%. The proposed scheme establishes the rationale for the sensory classification of cork using chromatographic data.

ACKNOWLEDGMENTS

C. Prat is the recipient of a PhD grant from the University of Girona and the Council of Palafrugell (BRAE 04/03). E. B. thanks project CTQ2006-04410/BQU of the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología. We thank TESA for providing cork material and helping in organoleptic analyses.

REFERENCES

Allard, A. S., Remberger, M., & Neilson, A. H. (1987). Bacterial O-methylation of halogen-substituted phenols. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(4), 839-845.

Álvarez-Rodríguez, M. L., López-Ocaña, L., López-Coronado, J. M., Rodríguez, E., Martínez, M. J., Larriba, G., & Coque, J. J. (2002). Cork taint of wines: role of the filamentous fungi isolated from cork in the formation of 2,4,6-trichloroanisole by o methylation of 2,4,6-trichlorophenol. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), 5860-5869.

Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR) (2004a). UNE 56928 Tapones de corcho. Análisis sensorial.

Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR) (2004b). UNE 56929 Tapones de corcho. Determinación y cuantificación de los residuos oxidantes.

Belitz, H. D., & Grosch, W. (1987). *Food Chemistry* (pp. 822). Berlin: Springer Verlag.

Boudaoud, N., & Eveleigh, L. (2003). A new approach to the characterization of volatile signatures of cork wine stoppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(6), 1530-1533.

Buser, H. R., Zanier, C., & Tanner, H. (1982). Identification of 2,4,6-Trichloroanisole as a Potent Compound Causing Cork Taint in Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30, 359-362.

Capone, D. L., Skouroumounis, G. K., Barker, D. A., McLean, H. J., Pollnitz, A. P., & Sefton, M. A. (1999). Absorption of chloroanisoles from wine by corks and by other materials. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 5, 91-98.

Chin, H. W., Bernhard, R. A., & Rosenberg, M. (1996). Solid Phase Microextraction for Cheese Volatile Compound Analysis. *Journal of Food Science*, 61, 1118.

Culleré, L., Cacho, J., & Ferreira, V. (2009). Comparative study of the aromatic profile of different kinds of wine cork stoppers. *Food Chemistry*, 112, 381-387.

Culleré, L., Escudero, A., Pérez-Trujillo, J. P., Cacho, J., & Ferreira, V. (2008). 2-Methyl-3-(methyldithio)furan: A new odorant identified in different monovarietal red wines from the Canary Islands and aromatic profile of these wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(8), 708-715.

Demyttenaere, J. C., Dagher, C., Sandra, P., Kallithraka, S., Verhe, R., & De Kimpe, N. (2003). Flavour analysis of Greek white wine by solid-phase microextraction-capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography.A*, 985(1-2), 233-246.

Insa, S., Besalu, E., Iglesias, C., Salvado, V., & Antico, E. (2006). Ethanol/Water extraction combined with solid-phase extraction and solid-phase microextraction concentration for the determination of chlorophenols in cork stoppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(3), 627-632.

James, M. (1985). *Classification Algorithms.* London, UK: Collins Publishers.

Juanola, R., Guerrero, L., Subira, D., Salvado, V., Insa, S., Garcia Regueiro, J. A., & Anticó, E. (2004). Relationship between sensory and instrumental analysis of 2,4,6-trichloroanisole in wine and cork stoppers. *Analytica Chimica Acta*, 513, 291-297.

M. Forina, S., Lanteri, C., Armanino, M. C., Cerrato-Oliveros, C., & Casolino, V. (2004). Parvus. An extendable package of programs for explorative data analysis, classification and regression analysis, Dipartimento di Chimica e Tecnologie Farmaceutiche ed Alimentari, Università di Genova, Italy, free available at http://www.parvus.unige.it.

Martí, M. P., Busto, O., & Guasch, J. (2004). Application of a headspace mass spectrometry system to the differentiation and classification of wines according to their origin, variety and ageing. *Journal of chromatography.A*, 1057(1-2), 211-217.

Mazzoleni, V., Caldentey, P., Careri, M., Mangia, A., & Colagrande, O. (1994). Volatile components of cork used for production of wine stoppers. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45, 401-406.

MINITAB, Minitab Inc., State College, PA (2004). , version 14 for Windows.

Pawliszyn, J. Solid phase microexraction. Theory and practice. Wiley, New York, 1997. .

Pérez-Coello, M. S., Sanz, J., & Cabezudo, M. D. (1998). Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Analysis of Volatile Compounds in Oak Wood Used for Ageing of Wines and Spirits. *Chromatographia Vol. 47, No. 7/8, April 1998*, 47(7/8), 427-432.

Prat, C., Trias, R., Culleré, L., Escudero, A., Anticó, E., & Bañeras, L. (In press). Off-odor compounds produced in cork by isolated bacteria and fungi: a gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-olfactometry study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

Prat, C., Anticó, E., & Bañeras, L. (2008). Screening of musty-earthy compounds from tainted cork using water-based soaks followed by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *European Food Research and Technology*, 227, 1085-1090.

Rocha, S. M., Delgadillo, I., & Ferrer Correia, A. J. (1996). GC-MS Study of volatiles of Normal and Microbiolocally Attacked Cork from *Quercus suber* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 865-871.

Saison, D., De Schutter, D. P., Delvaux, F., & Delvaux, F. R. (2008). Optimisation of a complete method for the analysis of volatiles involved in the flavour stability of beer by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A,* 1190(1-2), 342-349.

Siegmund, B., & Pollinger-Zierler, B. (2006). Odor thresholds of microbially induced off-flavor compounds in apple juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(16), 5984-5989.

Silva, G. A. d., Augusto, F., & Poppi, R. J. (2008). Exploratory analysis of the volatile profile of beers by HS–SPME–GC. *Food Chemistry,* 111(4), 1057-1063.

Siripatrawan, U., & Harte, B. R. (2007). Solid phase microextraction/gas chromatography/mass spectrometry integrated with chemometrics for detection of Salmonella typhimurium contamination in a packaged fresh vegetable. *Analytica Chimica Acta*, 581(1), 63-70.

Whiton, R. S., & Zoecklein, B. W. (2000). Optimization of Headspace solid-phase microextraction for Analysis of Wine Aroma Compound. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51, 379-382.

Wold, S., & Eriksson, L. (1995). Statistical validation of QSAR results. Validation tools. In *Chemometric Methods in Molecular Design* VCH, Weinheim: H. van de Waterbeemd, Eds.

Zhang, Z., & Pawliszyn, J. (1995). Quantitative Extraction Using an internally Cooled Solid Phase Microextraction Device. *Analytical Chemistry*, 67(1), 34-43.

4. DISCUSSIÓ

Els treballs recollits en el capítol anterior, que han estat publicats en revistes especialitzades, representen una aportació significativa de noves dades experimentals al tractament, des de diferents punts de vista, d'un problema que afecta tant a la indústria surera com als productors de vins: l'**aparició de defectes sensorials amb descriptors de florit-humitat**. Malgrat que els estudis realitzats s'han centrat exclusivament en el tap de suro com a element d'assaig, les dades aportades són també d'especial interès per al sector vinícola, sector industrial que representa el principal consumidor del suro per a l'embotellament i que és especialment sensible a l'aparició de defectes sensorials.

En l'estudi presentat s'han combinat tècniques pròpies de diferents disciplines científiques amb un objectiu comú. Aquest ventall de tècniques inclou anàlisis sensorials, tècniques analítiques cromatogràfiques (cromatografia líquida i de gasos), tècniques olfactomètriques i mètodes d'estudi de microorganismes, tant clàssics (basats en el cultiu i l'assaig fenotípic), com moleculars (basats en l'estudi de marcadors genètics). És obvi que la utilització de tècniques molt diverses pot repercutir en el grau de coneixement i aprofundiment que s'assoleix en cadascuna d'elles. Els coneixements i habilitats necessàries per a realitzar un estudi cromatogràfic o olfactomètric de mostres especialment complexes com el suro tenen poc a veure amb les que ens permetran aconseguir aïllar i mantenir microorganismes (bacteris i fongs) en cultiu pur. En aquest sentit, l'estudi realitzat ha estat particularment enriquidor. Per altra banda, l'ús de tècniques diverses amplia de forma significativa el grau de coneixement que es té d'un mateix problema i permet abordar-lo a un nivell molt més ampli, més integrador, més proper a la realitat. Des del punt de vista científic, aquesta visió és la que generalment aporta les millors solucions a problemes que es puguin plantejar.

Tenint en compte els objectius proposats en aquesta tesi es discuteixen els resultats obtinguts en tres apartats principals.

4.1 Millores metodològiques en l'anàlisi per SPME

El plantejament experimental per abordar un tema tant complex com l'anàlisi de compostos causants de desviacions sensorials en matrius complexes com el suro ha requerit dedicar un esforç considerable a l'establiment de les condicions idònies de treball. L'estudi de les aromes en suro, amb múltiples compostos implicats, s'ha iniciat amb el *desenvolupament i avaluació d'una metodologia basada en la microextracció en fase sòlida (SPME) i la cromatografia de gasos per a l'anàlisi simultània de compostos volàtils responsables del gust de florit-humitat en macerats de suro*.

El 2,4,6-tricloroanisole (TCA) es considera el principal responsable del gust de florit en el suro i és per això que la majoria de mètodes cromatogràfics a la indústria surera se centren en la determinació de compostos d'aquesta família i dels seus precursors, els triclorofenols. Val a dir que en un nombre significatiu de casos provats de presència d'olors desagradables, el TCA no apareix com a únic compost responsable, sinó que es troba sovint acompanyat d'altres molècules actives olfactivament. L'aparició d'estudis en que s'han detectat altres compostos odoritzants en vi o suro (1) ha fet sorgir la necessitat de desenvolupar mètodes més sensibles i selectius per a la seva anàlisi, i sobretot, mètodes que permetin la detecció i quantificació simultànies de varis compostos olfactivament actius com a sistema de control del producte. El primer objectiu d'aquest treball ha estat, doncs, el desenvolupament d'un mètode cromatogràfic per a l'anàlisi de TCA juntament amb altres compostos causants del gust de florit: geosmina (GSM), 2-metilisoborneol (MIB) i 3-isopropil-2-metoxipirazina (IPMP).

Els primers estudis sobre compostos causants de defectes sensorials en suro se centraven en l'anàlisi del contingut de TCA total, mitjançant l'extracció del tap de suro, normalment triturat, amb dissolvent orgànic. Amb aquesta tècnica es produeix el desplaçament de l'analit de la matriu que el conté cap al dissolvent. Per tal d'emular de manera més realista l'efecte d'aquest compost en el vi després del tapament es va introduir l'anàlisi de TCA alliberable, mitjançant macerats dels taps en aigua o solució

hidroalcohòlica. Amb aquest procediment no es pretén una extracció completa dels compostos presents al suro sinó reproduir el procés de transferència dels compostos de la superfície del tap cap al vi. Per això, en la determinació del TCA alliberable s'ha generalitzat l'ús de solucions hidroalcohòliques (entre 8 i 12 %) o de vins blancs de baixa graduació en alguns casos.

En aquest treball, així com en la resta dels que es recullen en aquesta tesi, s'ha escollit aigua com a matriu per realitzar els macerats de suro. La principal raó és que, en el dia a dia de les indústries productores de suro, les anàlisis sensorials de control es realitzen en macerats en aigua, la qual cosa permetrà una millor comparació de les dades químiques i sensorials. A més és sabut que la presència d'etanol en els macerats pot emmascarar l'aroma d'alguns dels compostos volàtils presents i resulta moltes vegades en una menor reproductibilitat de les àrees dels pics cromatogràfics quan es treballa amb la tècnica de SPME amb injecció manual.

Degut al baix llindar de percepció d'aquests compostos, és necessària una tècnica de preconcentració que garanteixi la sensibilitat requerida. S'ha escollit la tècnica de SPME, degut a la seva simplicitat i versatilitat. El mode d'operació escollit és el d'espai de cap ja que s'eviten els interferents no volàtils i la degradació de la fibra en contacte amb la matriu. S'avaluen el tipus de fibra (PDMS i DVB/CAR/PDMS), el temps i la temperatura d'extracció, fixant la quantitat de NaCl a una concentració propera a la saturació. La temperatura té un paper fonamental en la extracció dels analits, ja que influeix en els coeficients de partició dels compostos. S'ha avaluat l'extracció a dues temperatures 50 i 65 ºC per tal de comprovar si un augment de temperatura es tradueix en una major resposta. L'extracció a una temperatura més elevada només proporciona una millora en el rendiment d'extracció pel TCA quan s'utilitza la fibra DVB/CAR/PDMS, la resta de compostos analitzats amb qualsevol de les dues fibres no es veuen afectats per l'augment d'aquesta variable. La temperatura escollida finalment, 50 ºC, presenta menys problemes d'evaporació, i una millora de la repetibilitat al evitar la condensació d'aigua a les parets

del vial. A més els resultats presentats en el corresponent article demostren que el nivell de recuperació dels compostos assajats és perfectament acceptable.

El següent objectiu fou determinar si augmentant el temps d'extracció s'obtenia una millora significativa en l'extracció dels analits. Per això es treballa a dos temps d'extracció, 30 i 60 minuts. Les diferències en la resposta que s'obtenen allargant el temps d'extracció no són significatives; de manera que s'escull un temps de 30 minuts per reduir el temps d'anàlisi. Val a dir que la reducció del temps d'anàlisi és un aspecte especialment interessant en l'anàlisi de rutina.

Els recobriments de fibra estudiats son PDMS i DVB/CAR/PDMS, escollits tenint en compte les característiques físico-químiques dels compostos estudiats i la matriu aquosa utilitzada. La fibra combinada DVB/CAR/PDMS té una major capacitat d'extracció per a tots els analits. Aquests millors resultats s'expliquen per les interaccions π- π del DVB amb els compostos aromàtics i per la presència de Carboxen, que la fa adequada per compostos més volàtils.

Com a conclusió de totes les proves realitzades s'han establert les següents condicions experimentals utilitzades en tot l'estudi: una extracció de 30 min a 50 ºC utilitzant la fibra DVB/CAR/PDMS.

Un cop optimitzats els paràmetres d'extracció s'avalua el mètode analític. Per a tots els compostos, es va trobar una bona linealitat en un interval de 1-100 ng L^{-1} amb un coeficient de correlació major de 0,995. Pel que fa als límits de detecció (LOD) i als límits de quantificació (LOQ), calculats per una relació senyal/soroll de 3:1 i 10:1, respectivament, són adequats pels llindars de percepció sensorial d'aquests compostos. Per comprovar la repetibilitat del mètode s'extreuen set patrons aquosos a 25 ng L^{-1} en condicions idèntiques. La desviació estàndard relativa oscil·la entre el 6,9 i el 9,6%, què son valors acceptats pel mètode SPME. Per últim, per comprovar la influència d'altres components de la matriu en la qualitat de les dades analítiques, es van analitzar macerats

de suro fortificats utilitzant la metodologia optimitzada. Es van obtenir bones recuperacions (117-128%) per la majoria dels compostos estudiats.

El mode d'adquisició de MS seleccionat (*full scan*) combinat amb HS-SPME, té l'avantatge que permet la detecció en el mateix cromatograma de diferents compostos. En aquest cas ens permet analitzar també altres molècules relacionades amb aquest defecte: TeCA, PCA, TBA, MDMP i guaiacol. Però, per aprofitar d'aquest fet, cal verificar que, utilitzant les condicions experimentals optimitzades per TCA, IPMP, GSM, i MIB, els límits de detecció obtinguts són compatibles amb els llindars sensorials dels compostos (en la zona dels ng L^{-1} o ug L^{-1} pel PCA i guaiacol). Per tant, es van dur a terme mesures addicionals utilitzant patrons en solució aquosa de TeCA, PCA, TBA, MDMP i guaiacol, extrets i analitzats en les mateixes condicions experimentals.

Taula 1. Llindars de percepció en aigua i llindars de detecció del mètode pels compostos analitzats (1-8)

Compost	Llindar de percepció en aigua ng L^{-1}	Llindar de detecció ng L^{-1}
Geosmina (GSM)	10	2
Guaiacol (GUA)	-	500
2-metilisoborneol (MIB)	20	5
2-metoxi-3,5-dimetilpirazina (MDMP)	0,4	5
2-metoxi-3-isopropilpirazina (IPMP)	1-2	1
Pentacloroanisole (PCA)	-	3
2,3,4,6-tetracloroanisole (TeCA)	4	1
2,4,6-tribromoanisole (TBA)	-	2
2,4,6-tricloroanisole (TCA)	<1	1

En tots els casos, excepte la MDMP, els límits de detecció aconseguits amb el mètode desenvolupat són satisfactoris i es troben propers als llindars de percepció en macerats aquosos (Taula 1).

En conclusió, el mètode proposat és lineal, específic, precís i repetible i pot ser aplicat satisfactòriament per a la quantificació de TCA, GSM, MIB i IPMP de manera

simultània i permet detectar altres compostos amb descriptors de florit-humitat com TeCA, PCA, TBA, i MDMP.

El mètode desenvolupat s'ha aplicat a l'anàlisi química de mostres reals de suro. S'han analitzat mostres de suro amb defectes sensorials per a determinar la presència dels contaminants objecte d'estudi. S'han analitzat discs de suro i taps acabats. En gairebé tots els suros contaminats s'ha detectat la presència de TCA a concentracions més grans que el llindar de percepció descrits per aquest compost en aigua i vi (Taula 2).

Taula 2. Concentracions promig i error estàndard (entre parèntesis) de TCA i Guaiacol en les mostres analitzades.

Mostres	Concentració ng L^{-1}	
	TCA	Guaiacol
Taps defecte	85,6 (22,1)	1357 (86)
Taps control	4,7 (0,7)	1278 (83)
Discs defecte	37,9 (8,8)	3051 (1415)
Discs control	0,4 (0,2)	1256 (139)

Els altres compostos apareixien aleatòriament en algunes de les mostres analitzades. Així per exemple, GSM, MIB, i IPMP s'han detectat només en dues o tres mostres i a concentracions molt baixes. El TeCA, PCA, TBA i MDMP no s'han detectat en cap dels macerats de suro analitzats. Aquests resultats evidencien la importància quantitativa dels compostos analitzats com a responsables de l'aparició de defectes sensorials en macerats de suro.

Així podem concloure que el present treball constitueix una valuosa eina d'anàlisi per a la determinació de diversos compostos de manera senzilla, que és insistentment sol·licitada per la indústria surera i els cellers.

Les anàlisis sensorials són sempre subjectives malgrat les portin a terme un panell entrenat i seguint un procediment sistemàtic i adequat. Aquest component subjectiu constitueix la seva principal limitació quan s'apliquen a la classificació de mostres diverses

(taps de suro, begudes, aliments o altres). Així, en el cas particular de la classificació dels taps de suro segons les seves propietats sensorials, s'ha volgut avaluar la possibilitat d'utilitzar un nombre reduït de compostos volàtils com a variables classificatòries, mitjançant tècniques d'anàlisi multivariant. Amb aquest propòsit s'han utilitzat 78 taps seleccionats pels seus defectes sensorials i classificats en 6 grups –florit-humitat (ME), florit-humitat-TCA (ME-TCA), florit-humitat-vegetal (ME-VEG), vegetal (VEG), químic (CHEM) i un grup de mostres control- els quals s'han analitzat mitjançant el mètode de SPME descrit anteriorment. Les dades cromatogràfiques obtingudes han permès la determinació, de forma semi-quantitativa, de 20 composts pertanyents diferents famílies químiques (Taula 3). Aquestes dades es tracten amb tècniques d'anàlisi multivariant tal i com es comenta a continuació.

Taula 3. Llistat de compostos analitzats

Compostos analitzats	
linalol	β-terpineol
alcohol fenquílic	camfè
1,2-dimetoxibenzè	1-octen-3-ol
citronelal	octanol
càmfora	limonè
alcohol benzílic	1,8-cineol
borneol	α-terpinolè
acetat d'isomentil	guaiacol
benzotiazole	octanal
geraniol	TCA

Després d'una primera anàlisi exploratòria mitjançant l'anàlisi de components principals (PCA) i de considerar que les mostres pertanyents als grups ME i ME-VEG, les quals compartien la majoria dels descriptors sensorials considerats, es podien fusionar en un sol grup, s'ha utilitzat l'anàlisi discriminant lineal (LDA) com a mètode de classificació entre les categories prèviament definides -classes sensorials- utilitzant el mòdul STEPLDA del programa V-PARVUS (9). Aquest programa cerca funcions discriminants definides per un nombre reduït de variables. En un primer pas es determinen les variables que contribueixen a la discriminació dels grups, per després obtenir les variables canòniques

que expressen el model. El mètode s'ha validat utilitzant un procediment de *leave-one-out cross-validation* (10).

Així es determinen 5 compostos discriminants: TCA, alcohol fenquílic, 1-octen-3-ol, alcohol benzílic i benzotiazole, que permeten discriminar entre els 5 grups definits *a priori* amb una bona capacitat de predicció (fins al 100% per les mostres control i ME-TCA). Cal remarcar que tots els compostos seleccionats en el model havien estat prèviament detectats en mostres de suro atacades per microorganismes (11, 12).

Així podem dir que s'aconsegueix una classificació dels taps en funció de les seves propietats sensorials utilitzant una metodologia objectiva, emprant el mètode cromatogràfic de quantificació del TCA alliberable i ampliant l'anàlisi a altres compostos que permeten discriminar altres grups de defectes sensorials.

4.2 Microorganismes actius en el procés de bio-transformació i generació d'aromes desagradables

La participació de microorganismes (bacteris i fongs) en la transformació de la matèria orgànica és ben sabuda i pot ser una de les úniques formes de transformació per a compostos altament perdurables com el suro. És evident que un estudi sobre els processos de transformació i aparició de males olors en suro havia d'incloure una part d'anàlisi dels microorganismes potencialment responsables d'aquesta activitat com a complement als mètodes químics d'anàlisi. Aquesta evidència constitueix l'eix principal del segon objectiu plantejat en aquesta tesi en el que es valora *l'aplicació de tècniques de fingerprinting molecular a la identificació de microorganismes, en mostres de suro de diferent naturalesa i a diferents fases del procés de manufactura*.

Com s'ha dit abans, la mesura del TCA extraïble en macerats aquosos de suro s'utilitza comunament com a forma d'assegurar la qualitat dels taps de suro a la indústria. Tot i que clorofenols i cloroanisoles han centrat l' atenció en aquest camp, altres

molècules com IPMP i MDMP, s'han vist recentment incriminades en la producció de defectes sensorials en suro (1, 13). És interessant remarcar que el principal origen tant de cloroanisoles com de les pirazines mencionades és l'activitat biològica de fongs i bacteris. Els anisoles es produeixen biològicament per la metilació dels corresponents substrats fenòlics, reacció freqüent en molts fongs aïllats de suro (14, 15). Les pirazines, en canvi, poden tenir un origen biològic o bé derivar de reaccions químiques depenents de la temperatura. La seva producció biològica inclou reaccions de transformació dels aminoàcids que poden estar catalitzades per diferents bacteris i fongs (14, 15).

En general, se suposa que anisoles i altres molècules actives sensorialment es produeixen en les etapes inicials de la fabricació de suro, fins i tot abans de la lleva de les planxes de suro, però això no descarta la possibilitat que el desenvolupament de defectes sensorials es doni en etapes posteriors i fins i tot en els taps acabats. Els fongs filamentosos són relativament abundants en la majoria de les etapes de la fabricació de suro i d'aquí la importància de conèixer la diversitat dels microorganismes en les etapes finals de fabricació del suro per tal de prevenir la formació de compostos que poden produir defectes sensorials en els taps. Amb aquesta finalitat s'ha utilitzat un mètode per a l'estudi de la diversitat de fongs i bacteris en mostres de suro basat en l'anàlisi de marcadors genètics, l'anàlisi en gradients electroforètics desnaturalitzants (DGGE, *Denaturing gradient gel electrophoresis*).

La DGGE és una tècnica molt utilitzada en ecologia microbiana i permet realitzar la identificació dels microorganismes presents en base a la separació i seqüenciació de marcadors genètics coneguts. La identificació dels microorganismes més abundants en el suro s'ha considerat com un element essencial per comparar els resultats amb altres treballs realitzats. Els marcadors genètics utilitzats han estat la subunitat petita del RNA ribosomal (16S rRNA) i el fragment intergènic ITS1 per als bacteris i els fongs, respectivament.

Aquests mètodes microbiològics s'han aplicat a l'estudi de mostres de suro classificades sensorialment per personal qualificat a les empreses proveïdores. És ben sabut que malgrat que el TCA és el principal causant de males olors en suro i centra bona part de l'atenció científica i empresarial, existeixen altres olors igualment molestes que, malgrat ser menys freqüents, poden suposar el rebuig de lots de taps per les empreses embotelladores. En aquest treball incloem en l'anàlisi mostres amb descriptors de florit-humitat que no presenten una nota clara de TCA. En els estudis realitzats s'ha treballat bàsicament amb tres classes sensorials de taps i discs: florit-humit clarament identificable com a TCA (ME-TCA), florit-humit no relacionat amb TCA (ME) i mostres sense defecte (C). S'analitzen dos tipus de mostra, discs de suro i taps de cava, com a representació d'una etapa intermèdia i final del procés de fabricació de taps. Els resultats de l'anàlisi química només mostren quantitats per sobre del nivell de detecció per TCA, GUA i MDMP. La MDMP s'ha analitzat en aquest cas utilitzant un mètode desenvolupat en col·laboració amb el grup del Dr. M. Sefton de l'*Australian Wine Research Institute* (AWRI, Glenn Osmond, Australia), actualment professor a la Universitat d'Adelaida (Australia), que millora els límit de detecció i sensibilitat per la determinació d'aquest compost mitjançant SPME.

La resta de compostos analitzats no es detecten a cap de les mostres analitzades. Tal i com era d'esperar les mostres classificades com a ME-TCA, tant taps com discs, presenten un valor de TCA notablement més elevat que les mostres ME i els controls. En el cas del GUA, els valors són semblants a totes les mostres de taps, mentre que pels discs es detecta una concentració més elevada a les mostres ME-TCA. Les mostres ME, en canvi, presenten com a diferència més destacada respecte les mostres ME-TCA valors més elevats de MDMP, però no hi ha diferències significatives amb les mostres control. Aquest fet ens porta a suposar que la presència de notes de florit-humitat no relacionades amb TCA no és provocada exclusivament per l'acumulació de MDMP sinó que podria ser deguda a la coexistència de diferents compostos. Malauradament, no hem aconseguit evidències suficients per a corroborar aquesta possibilitat.

Un dels aspectes interessants de l'estudi proposat ha estat comparar l'estructura de la comunitat microbiana de diferents taps i discs amb la prèvia classificació sensorial d'aquests i l'acumulació de determinats compostos volàtils. Val a dir que el suro és un material difícil de treballar degut a que conté una elevada concentració de fenols lliures, propis de la degradació del material vegetal, que poden dificultar la purificació dels àcids nucleics i actuar com a inhibidors de les reaccions d'amplificació. Aquest motiu ha condicionat segurament que l'anàlisi microbiològica de les mostres ME-TCA s'ha restringit als discs, mentre que no ha estat possible obtenir amplificació d'ADN de cap de les mostres de taps. Les seqüències específiques ITS1 recuperades dels discs contaminats amb TCA mostren altes similituds amb *P. islandicum* i *P. variabile*. Aquesta última espècie ha estat descrita anteriorment en suro (16). Ambdues espècies presenten certes homologies amb *Penicillium purpurogenum,* productor moderat de TCA (14). Aquests resultats ens porten a concloure que, al menys en els discs analitzats, algunes espècies de *Penicillium* es podrien considerar com a potencials productors del TCA en condicions naturals.

En canvi, la relació entre la presència d'altres compostos causants de defectes sensorials diferents de TCA i de microorganismes específics no és evident a partir de les nostres dades. En aquest cas estaríem parlant d'un procés complex, en el que se suposa que hi contribueixen diferents microorganismes, i no tots en el mateix sentit. Mitjançant l'anàlisi de *fingerprinting* s'han detectat exclusivament als taps amb defecte ME el fong *Eurotium repens* i els bacteris *Novosphingobium subarcticum, Sphingobium* spp. *Acinetobacter lwofii,* i *Pseudomonas* spp. Tot i que es coneix la capacitat d'algunes espècies de sintetitzar MDMP o altres dialquil metoxipirazines (15, 17), no existeixen dades experimentals per a la producció de metoxipirazines per les espècies detectades o organismes filogenèticament similars a excepció de *Pseudomonas*.

Per altra banda, també els taps control presenten particularitats en el seu anàlisi microbiològic. La presència selectiva de *P. aeruginosa* i *P. putida*, juntament amb alguns *Actinobacteria* suggereix que aquests microorganismes puguin veure's implicats en la

degradació dels compostos causants de defecte. La degradació de pirazines a través de l'activitat microbiana ha estat prèviament documentada en diverses soques bacterianes, incloent soques de *Rhodococcus*, i *Mycobacterium* (18, 19), encara que no existeixen dades específiques per MDMP. Una investigació posterior amb l'ús de determinades soques capaces de produir o degradar derivats de pirazines segueix sent necessària per comprendre plenament l'acumulació d'aquests compostos en matrius de suro. A més, algunes soques de *Pseudomonas i Acinetobacter,* s'han descrit com a capaces de degradar cloroanisoles (20). Aquest fet suggereix que algunes soques bacterianes, especialment del gènere *Pseudomonas,* poden tenir una complexa interacció amb els compostos causants de defectes sensorials.

En conclusió, l'ús de PCR-DGGE com a tècnica selectiva ens ha permès caracteritzar la relació entre la composició de la comunitat microbiana i alguns dels defectes sensorials més comuns en el suro. La detecció de TCA en els discs de suro amb defecte ME-TCA coincideix amb seqüències relacionades amb *P. variabile* en gairebé totes les mostres analitzades. Per altra banda, la participació de microorganismes en altres tipus de desviacions (ME) no s'ha pogut caracteritzar amb tanta precisió i se suposa l'existència d'una interacció mixta en el sentit de producció i/o degradació dels compostos sospitosos (TCA i MDMP) catalitzada per microorganismes diversos.

4.3 Agents biològics productors de defectes sensorials. Estudi olfactomètric amb organismes aïllats.

L'origen natural del suro i el seu procés de manufactura, llarg i amb un gran nombre d'etapes, contribueix al desenvolupament d'un ecosistema microbià sobre la superfície del suro, que pot estar implicat en la formació de desviacions sensorials. A l'apartat anterior s'ha valorat l'aplicació de la DGGE com a eina per identificar els microorganismes potencialment actius en el desenvolupament de males olors. Malgrat que els resultats obtinguts són prometedors, no hem d'oblidar que aquest tipus d'estudis

estableixen relacions potencials entre els microorganismes detectats i els compostos químics analitzats. Calen estudis més directes en els que es mesuri i *s'avaluï de forma controlada la capacitat de producció de defectes sensorials per microorganismes aïllats de suro*. Aquest ha estat el tercer objectiu plantejat a la tesi i s'ha desenvolupat utilitzant *tècniques olfactomètriques* i assajos amb bacteris i fongs aïllats de suro amb desviacions sensorials. La majoria de treballs que han documentat la biosíntesi de compostos causants de defectes sensorials (TCA, pirazines, geosmina, guaiacol...) s'han realitzat en condicions ideals, per exemple cultius líquids o suro fortificat (14, 21). És per això que hem cregut necessari un estudi utilitzant matrius de suro reals, sense addicionar.

El suro presenta un perfil aromàtic complex format per un gran nombre de compostos, alguns d'aquests són coneguts però d'altres no han estat identificats. Per aquest fet s'han utilitzat tècniques olfactomètriques (GC-O) per tal de determinar compostos "aroma actius", susceptibles de causar defectes sensorials en suro.

En aquest estudi s'han analitzat l'efecte que té la inoculació de cultius purs de microorganismes en l'aparició de desviacions sensorials. Un total de 31 microorganismes que comprenen 5 llevats, 13 fongs filamentosos i 13 bacteris van ser aïllats de mostres de suro classificat com a defectuós sensorialment. Els aïllaments s'han realitzat utilitzant mètodes convencionals en microbiologia a partir dels macerats de suro en aigua. A més, un llevat i sis bacteris addicionals es van obtenir a partir de controls microbiològics de rutina, proporcionats per una de les empreses de fabricació i es van afegir a la col·lecció.

A la taula 3 es mostren les identificacions obtingudes segons la homologia de la seqüència de la regió ITS1-5.8S-ITS2 en el cas dels fongs i del gen 16S rRNA per els bacteris. Tots els fongs i llevats, excepte *Penicillium roquefortii* han estat prèviament descrits com a espècies comunes en planxes de suro i podrien estar presents des de l'inici del procés de fabricació de suro. En canvi, les soques aïllades de *Pseudomonas* difereixen de les descrites en estudis anteriors.

Taula 3. Identificació més probable dels microorganismes aïllats en mostres de suro.

Identificació més probable	Nombre d'aïllats
Llevats	
Aureobasidium pullulans	2
Cryptococcus sp.	1
Rhodotorula mucilaginosa	1
Rhodotorula sp.	2
Fongs filamentosos	
Penicillium glabrum	6
Penicillium glandicola	1
Penicillium roquefortii	2
Penicillium variabile	1
Trichoderma viride	3
Bacteria	
Bacillus megaterium	2
Bacillus sp.	2
Curtobacterium flacumfaciens	1
Enterobacter sp.	1
Phyllobacterium myrsinacearum	1
Pseudomonas fluorescens	3
Pseudomonas jessenii	1
Pseudomonas putida	4
Pseudomonas sp.	2
Stenotrophomonas maltophilia	2

Curiosament, quatre dels sis aïllats bacterians proporcionats per les empreses manufactureres de suro pertanyen al gènere *Bacillus*, que no s'ha trobat en el suro defectuós. La contaminació bacteriana de suro és un procés força complex i les espècies poden variar en funció de molts factors ambientals. Malgrat que existeixen algunes similituds entre els filotips microbians obtinguts en cultiu i els detectats per DGGE, hi ha diferències notables pel que fa als grups més representats. Aquest és un fet comú en aquest tipus d'estudis ja que s'apliquen tècniques d'anàlisi completament diferents que afavoreixen la detecció de determinats grups. Un dels aspectes interessant és l'obtenció d'un aïllat de *Penicillium variabile* amb 100 % d'homologia en la seqüència de ITS1 amb la detectada per DGGE en els taps amb presència de TCA. Aquest fet ens permet analitzar de forma directe la capacitat d'aquest aïllat de produir TCA en condicions de laboratori. A més, s'han obtingut 9 aïllats de *Pseudomonas* que han estat relacionats amb la producció

i degradació de compostos aromàticament actius. Actualment estem estudiant la capacitat d'aquests aïllats de produir pirazines en condicions de laboratori.

S'ha estudiat la capacitat dels microorganismes aïllats de desenvolupar compostos que poden ser responsables d'olors desagradables en tres matrius de suro diferents (granulat de suro, taps aglomerats i taps naturals). Després de 30 dies d'incubació es realitza l'anàlisi sensorial i olfactomètrica dels macerats. En aquest estudi s'inclouen mostres amb els següents descriptors sensorials: controls, florit-humitat, florit-humitat TCA i aromes vegetals i químics. La majoria dels aïllats van ser capaços de produir desviacions sensorials en suro en diferents graus. La major incidència de desenvolupament de defectes sensorials es troben en els assaigs de mostres inoculades amb fongs. Només dos aïllats, un de *Aureobasidium pullulans* i un altre de *Penicillium glabrum,* no han produït olors desagradables en cap de les matrius de suro. Les soques amb més capacitat de producció de defectes corresponen a aïllats de *Penicillium variabile*, *Penicillium glabrum* i *Aureobasidium pullulans*. Aquests resultats suggereixen que existeix una alta heterogeneïtat dins d'una determinada espècie de fong pel que fa a la capacitat de desenvolupar defectes i indica que és necessària una anàlisi a nivell de soca per definir un organisme aïllat com un possible productor de defectes. Els bacteris mostren una incidència relativament menor en el desenvolupament de compostos causants de defectes. Dintre d'aquests, soques de *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas jessenii* i *Stenotrophomonas maltophilia* són els que mostren major incidència de defectes.

Globalment, els descriptors que apareixen amb més freqüència són florit-humit-TCA, florit-humit i vegetal. Els resultats dels experiments d'incubació presenten diferències segons la naturalesa del suro. El suro granulat és el substrat més sensible al desenvolupament d'olors desagradables. Aquest fet es pot atribuir a la seva gran relació superfície-volum, la qual cosa augmentarà el creixement i l'activitat metabòlica dels microorganismes. A més, el suro granulat es deriva d'una barreja complexa de suro de diferents orígens i de diferent qualitat i coles aglutinants, fets que poden augmentar la presència de compostos metabolitzables que poden conduir al desenvolupament de

defectes. El suro natural ha resultat ser el material més segur. La incidència de desenvolupament de defectes va ser sempre per sota del 5% dels suros inoculats.

Donat que els defectes més freqüents detectats en els experiments d'incubació han estat, florit-humit, florit-humit-TCA i vegetals, es varen analitzar els macerats aquosos de taps que presenten aquests defectes mitjançant cromatografia de gasos-olfactometria (GC-O) i cromatografia de gasos-espectrometria de masses (GC-MS). També es van incloure mostres control consistents en suro granulat no-inoculat incubades en les mateixes condicions experimentals. La mostra control presenta un perfil aromàtic amb nou odorants detectats a baixa intensitat. Aquests resultats posen de manifest que les matrius utilitzades són complexes amb múltiples notes que poden alterar la detecció dels compostos "aroma actius" associats a les classes sensorials establertes. La mostra de macerat amb una nota florit-humit es caracteritza per una alta intensitat de 2-metoxi-3,5-dimetilpirazina, i per la presència en exclusiva de 2-metilisoborneol i geosmina -compostos caracteritzats per una nota "terrós, molsa"-. Tot i que aquests dos últims odorants es perceben per separat a baixa intensitat, experiències paral·leles han demostrat que existeix entre ells un efecte sinèrgic. En la mostra descrita sensorialment com a vegetal, destaca la presència d'octanal (que no s'ha trobat en cap altre macerat) i la 2-metoxi-3,5-dimetilpirazina. Per últim, a la mostra amb la nota de florit-humit-TCA s'ha trobat TCA a una intensitat elevada, i dos altres compostos amb descriptors de florit que malauradament no han pogut ser identificats.

La caracterització de macerats de granulat de suro inoculats es va complementar amb l'anàlisi química utilitzant el mètode desenvolupat en aquesta tesi. Malgrat que el nombre de compostos que s'analitzen és elevat, només el TCA i guaiacol han pogut ser quantificats a les mostres. La concentració de guaiacol no difereix significativament entre el control i els suros inoculats. Alguns odorants clau segons les anàlisis GC-O com l'octanal, la MDMP i el Z-2-nonenal no han pogut ser quantificats pel mètode GC-MS utilitzat. Aquest fet demostra la potència de la GC-O per caracteritzar la composició aromàtica de mostres de suro amb defectes diferents del causat pel TCA i ens permet

detectar compostos que passarien desapercebuts en un anàlisi mitjançant cromatografia de gasos amb detecció espectromètrica degut a la seva baixa concentració.

Si s'analitza conjuntament les dades sensorials i les dades obtingudes en l'anàlisi cromatogràfica, en relació amb els microorganismes inoculats, es poden extreure diferents conclusions. Una comparació detallada dels resultats obtinguts per a la incidència de defectes i l'acumulació de TCA en el suro mostra que hi ha una manca de coincidència de la majoria de les soques. Només una petita part dels defectes generats es poden atribuir al TCA. Aquest resultat indica que altres compostos "aroma actius" es generen i s'acumulen en el suro. A més, la diversitat intrínseca dels microorganismes que creixen sobre la superfície dels taps pot suggerir l'existència de diferències específiques entre les soques d'una mateixa espècie en la capacitat de producció de TCA. Les dades de l'anàlisi química descriuen per primera vegada la producció de TCA en aïllats de *Cryptococcus sp.* i *Rhodotorula sp*. - microorganismes comunament trobats en el suro -. Altres soques productores de TCA són el bacteri *Pseudomonas jessenii* A1 i els fongs filamentosos *Penicillium glabrum* F001 i *P. variabile* F003A; els dos darrers són els productors més importants de TCA entre els fongs filamentosos estudiats. Diferents soques identificades com a *Penicillium glabrum* divergeixen en els valors d'incidència de defectes i la producció de TCA. En alguns casos (aïllats F003B, F005 i F006) la incidència de defectes -majoritàriament florit-humit i vegetal- va ser superior al 30% dels inòculs de suro. La producció de TCA també difereix notablement entre ells, la soca F001 presenta una capacitat de producció molt més alta que la resta. Sorprenentment, l'aïllat A1, que produeix valors de TCA molt elevats i similars als dels fongs, es va obtenir de les colònies que creixen en les plaques utilitzades per les anàlisis regulars de microbiologia realitzades a les empreses de fabricació, sense selecció de mostres de suro amb defecte. Per desgràcia no es disposa de dades per indicar la seva abundància en el procés de fabricació del suro i per avaluar el risc de desenvolupament de defectes.

4.4 Referències

1. Simpson, R.F.; Capone, D.L.; Sefton, M.A. Isolation and identification of 2-methoxy-3,5-dimethylpyrazine, a potent musty compound from wine corks. *J. Agric. Food Chem.* **2004,** *52,* 5425-5430.

2. Sala, C.; Busto, O.; Guasch, J.; Zamora, F. Contents of 3-alkyl-2-methoxypirazines in musts and wines from *Vitis vinifera* variety Cabernet Sauvignon: influence of irrigation and plantation density. *J. Sci. Food Agric.* **2005,** *85,* 1131-1136.

3. Sala, C.; Mestres, M.; Marti, M.P.; Busto, O.; Guasch, J. Headspace solid-phase microextraction analysis of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wines. *J. Chromatogr. A* **2002,** *953,* 1-6.

4. Sala, C.; Busto, O.; Guasch, J.; Zamora, F. Influence of vine training and sunlight exposure on the 3-alkyl-2-methoxypyrazines content in musts and wines from the Vitis vinifera variety cabernet sauvignon. *J. Agric. Food Chem.* **2004,** *52,* 3492-3497.

5. Chatonnet, P.; Bonnet, S.; Boutou, S.; Labadie, M.D. Identification and responsibility of 2,4,6-tribromoanisole in musty, corked odors in wine. *J. Agric. Food Chem.* **2004,** *52,* 1255-1262.

6. Darriet, P.; Pons, M.; Lamy, S.; Dubourdieu, D. Identification and quantification of geosmin, an earthy odorant contaminating wines. *J. Agric. Food Chem.* **2000,** *48,* 4835-4838.

7. Silva Pereira, C.; Pires, A.; Valle, M.J.; Vilas Boas, L.; Figueiredo Marques, J.J.; San Romão, M.V. Role of Chrysonilia sitophila in the quality of cork stoppers for sealing wine bottles. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **2000,** *24,* 256-261.

8. Silva Pereira, C.; Figueiredo Marques, J.J.; San Romao, M.V. Cork taint in wine: scientific knowledge and public perception: a critical review. *Crit. Rev. Microbiol.* **2000,** *26,* 147-162.

9. Forina, M.; Lanteri, S.; Armanino, M.C.; Cerrato-Oliveros, C.; Casolino, V. Parvus. An extendable package of programs for explorative data analysis, classification and regression analysis, Dipartimento di Chimica e Tecnologie Farmaceutiche ed Alimentari, Università di Genova, Italy, free available at http://www.parvus.unige.it. **2004,**

10. Wold, S. and Eriksson, L. Statistical validation of QSAR results. Validation tools, In *Chemometric Methods in Molecular Design,* Anonymous ; H. van de Waterbeemd, Eds.: VCH, Weinheim, 1995;

11. Rocha, S.M.; Delgadillo, I.; Ferrer Correia, A.J. GC-MS Study of volatiles of Normal and Microbiolocally Attacked Crk from *Quercus suber* L. *J. Agric. Food Chem.* **1996,** *44,* 865-871.

12. Pérez-Coello, M.S.; Sanz, J.; Cabezudo, M.D. Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Analysis of Volatile Compounds in Oak Wood Used for Ageing of Wines and Spirits. *Chromatographia Vol. 47, No. 7/8, April 1998* **1998,** *47,* 427-432.

13. Sefton, M.A. and Simpson, R.F. Compounds causing cork taint and the factors affecting their transfer from natural cork closures to wine-a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2005,** *11,* 226-240.

14. Álvarez-Rodríguez, M.L.; López-Ocaña, L.; López-Coronado, J.M.; Rodríguez, E.; Martínez, M.J.; Larriba, G.; Coque, J.J. Cork taint of wines: role of the filamentous fungi isolated from cork in the formation of 2,4,6-trichloroanisole by o methylation of 2,4,6-trichlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002,** *68,* 5860-5869.

15. Cheng, T.B.; Reineccius, G.A.; Bjorklund, J.A.; Leetet, E. Biosynthesis of 2-Methoxy-3-isopropylpyrazine in *Pseudomonas perolenst*. *J. Agric. Food Chem.* **1991,** *39,* 1009-1012.

16. Serra, R.; Peterson, S.; CTCOR; Venancio, A. Multilocus sequence identification of Penicillium species in cork bark during plank preparation for the manufacture of stoppers. *Res. Microbiol.* **2008,** *159,* 178-186.

17. Besson, I.; Creuly, C.; Gros, J.B.; Larroche, C. Pyrazine production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation on soybeans. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1997,** *47,* 489-495.

18. Rappert, S.; Li, R.; Kokova, M.; Antholz, M.; Nagorny, S.; Francke, W.; Muller, R. Degradation of 2,5-dimethylpyrazine by Rhodococcus erythropolis strain DP-45 isolated from a waste gas treatment plant of a fishmeal processing company. *Biodegradation* **2007,** *18,* 585-596.

19. Rappert, S.; Botsch, K.C.; Nagorny, S.; Francke, W.; Muller, R. Degradation of 2,3-diethyl-5-methylpyrazine by a newly discovered bacterium, Mycobacterium sp. strain DM-11. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006,** *72,* 1437-1444.

20. Goswami, M.; Recio, E.; Campoy, S.; Martin, J.F.; Coque, J.J. Environmental significance of O-demethylation of chloroanisoles by soil bacterial isolates as a mechanism that improves the overall biodegradation of chlorophenols. *Environ. Microbiol.* **2007,** *9,* 2512-2521.

21. Prak, S.; Gunata, Z.; Guiraud, J.P.; Schorr-Galindo, S. Fungal strains isolated from cork stoppers and the formation of 2,4,6-trichloroanisole involved in the cork taint of wine. *Food Microbiol.* **2007,** *24,* 271-280.

5. CONCLUSIONS

Del conjunt de resultats d'aquest treball se'n poden treure les següents conclusions:

1. S'ha desenvolupat i validat un mètode basat en la microextracció en fase sòlida i l'anàlisi per cromatografia de gasos amb detecció per espectrometria de masses per a la determinació conjunta de TCA, IPMP, GSM, i MIB en macerats de suro. En funció de les proves realitzades, les millors condicions experimentals són: 50 ºC de temperatura durant 30 minuts utilitzant la fibra combinada DVB/CAR/PDMS.

2. S'ha aplicat el mètode a discs i taps acabats i s'ha detectat la presència de TCA en la majoria de les mostres classificades com a defectuoses. El mateix mètode ha permès la quantificació del guaiacol a nivells de concentració inferiors al seu llindar de percepció.

3. Lleugeres modificacions en les condicions assajades en l'anàlisi per HS-SPME-GC han fet possible la caracterització detallada de la fracció volàtil de macerats de suro, la qual cosa ens ha permès ampliar l'aplicació del mètode a la determinació semiquantitativa d'un total de 20 compostos que es detecten simultàniament.

4. Malgrat que en alguns casos no s'han obtingut prou evidències experimentals per relacionar els compostos determinats a la fracció volàtil dels macerats analitzats amb les desviacions sensorials inspeccionades, l'estudi multivariant de les dades cromatogràfiques obtingudes a partir de la fracció volàtil ens ha permès diferenciar-les amb un grau de fiabilitat elevat. Aquest fet comporta que es puguin definir una sèrie de compostos signatura, TCA, alcohol fenquílic, 1-octen-3-ol, alcohol benzílic i el benzotiazole com a elements per a la diagnosi de desviacions sensorials en suro.

5. L'anàlisi dels macerats de suro mitjançant tècniques olfactomètriques permet la determinació de compostos "aroma actius" en suro com ara l'octanal, la 2-

metoxi-3,5-dimetilpirazina (MDMP), el Z-2-nonenal i altres que no es detecten amb el mètode d'anàlisi cromatogràfica utilitzat. Alguns d'aquests compostos s'han detectat exclusivament en taps classificats en diferents desviacions sensorials de tipus resclosit, vegetal o química.

6. La implicació dels diferents microorganismes presents en el suro en l'aparició d'aromes desagradables ha quedat demostrada tant per l'anàlisi indirecte de *fingerprinting* mitjançant PCR-DGGE de marcadors filogenètics (ITS1 en fongs, i 16S rRNA en bacteris), com per la realització d'incubacions amb bacteris i fongs aïllats prèviament de mostres de suro.

7. En la majoria de casos, desviacions de tipus TCA en discs de suro coincideixen amb la presència de *Penicillium variabile* segons l'elevat índex de similitud de les seqüències recuperades. La incubació d'aïllats amb seqüències del fragment ITS1 100% idèntiques a les recuperades per PCR-DGGE, demostren la seva capacitat de produir TCA en suro no modificat.

8. L'anàlisi de taps amb desviacions de tipus florit-humitat sense presència de TCA mitjançant PCR-DGGE demostra que l'estructura de comunitat microbiana és més complexa amb un nombre elevat de microorganismes exclusius com el fong *Eurotium repens* i els bacteris *Novosphingobium subarcticum, Sphingobium* spp. *Acinetobacter lwofii,* o *Pseudomonas* spp. Aquest fet ens demostra que la producció de compostos olfactivament actius diferents del TCA és un procés complex en el que poden intervenir tant processos de producció com de degradació.

9. La majoria d'aïllats obtinguts de suro són capaços de produir desviacions sensorials en suro en diferents graus. La major incidència de desenvolupament de defectes sensorials es troba en els assaigs de mostres inoculades amb fongs. Malgrat això, l'elevada heterogeneïtat detectada entre diferents aïllats d'una mateixa espècie plantegen l'existència de diferències a nivell de soca pel que fa a la capacitat de produir compostos "aroma actius" en suro.

Agraïments

No voldria acabar aquesta tesi sense agrair a tothom que, d'una manera o d'una altra, m'ha ajudat durant la realització d'aquest treball.

En primer lloc vull donar les gràcies als meus directors, l'Enriqueta i en Catxo, per la confiança dipositada en mi, per la seva dedicació a aquest treball i sobretot perquè en aquests anys amb vosaltres he aprés moltíssim.

A tots els companys de l'àrea de química analítica i de microbiologia per la vostra ajuda i bons consells durant aquesta etapa. Vull agrair especialment a la Mireia, l'Ester i la Sara la seva amistat més enllà de la facultat. A la Sara a més li he d'agrair que m'ensenyés tots els secrets de la SPME i del cromatògraf de gasos. Gràcies per la teva paciència! A la Rosalia i la Laia M. per la seva ajuda al laboratori de micro, però sobretot gràcies per les bones estones passades.

Al Dr. Sefton de la Universitat d'Adelaida (Australia), per la seva col·laboració en l'anàlisi química de la 2-metoxi-3,5-dimetilpirazina en els macerats de suro.

Els estudis olfactomètrics per aquesta tesi s'han portat a terme al "Laboratorio de análisis del aroma y enología" de la Universitat de Saragossa. Quisiera dar las gracias a los doctores Juan Cacho y Vicente Ferreira por darme la oportunidad de trabajar en su grupo. Y muy especialmente a Ana y Laura por su colaboración en los estudios olfatométricos. Parte de este trabajo no hubiera sido posible sin vosotras.

Voldria agrair a en Santi, la persona que em va introduir al món de la recerca, per animar-me a continuar per aquest camí i haver mantingut l'amistat durant tots aquests anys.

A part de les persones relacionades directament amb la recerca. vull donar les gràcies a la meva família i amics que sempre em fan costat. A la meva mare per la confiança que té en tot el que em proposo i pel seu recolzament en tot moment. Als meus germans Joan Pau, Joël i Nora perquè sempre puc comptar amb ells pel que faci falta. I a en Josep per ajudar-me amb el disseny de la portada.

I finalment, a en Quim, pel seu optimisme, per estar sempre al meu costat i per tenir molta més confiança en mi que jo mateixa.

Moltes gràcies a tots.

Chantal