

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y MICROBIOLOGÍA**

**EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA DE TAPONES DE  
CORCHO PARA VINOS**

**TESIS DOCTORAL**

**SARA CENTENO BRICEÑO**

**ENERO 2001**

# INDICE

	Página
<b>RESUMEN</b>	VII
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	2
<b>1.1. CARACTERÍSTICAS DEL CORCHO</b>	2
1.1.1. Constitución química	3
1.1.2. Propiedades físicas	5
<b>1.2. PROCESO DE PRODUCCIÓN DE LOS TAPONES DE CORCHO</b>	6
1.2.1. Proceso de producción de los tapones de corcho para vinos tranquilos	6
1.2.2. Producción de tapones para vinos espumosos	9
<b>1.3. NORMALIZACIÓN Y CONTROL DE CALIDAD DE LOS TAPONES DE CORCHO</b>	9
1.3.1. Control de calidad microbiológico de los tapones de corcho	10
<b>1.4. LA MICROBIOLOGÍA DEL CORCHO</b>	11
1.4.1. Acción de los microorganismos en el corcho	14
1.4.1.1. Actividad enzimática de los microorganismos	15
1.4.2. Metabolismo secundario	18
1.4.2.1. Producción de micotoxinas	20
1.4.2.1.1. Micotoxinas de <i>Aspergillus</i>	21
1.4.2.1.2. Micotoxinas de <i>Penicillium</i>	21
1.4.2.1.3. Micotoxinas de <i>Fusarium</i>	22
1.4.2.1.4. Micotoxinas de <i>Alternaria</i>	22
1.4.2.2. Producción de compuestos volátiles	25
1.4.2.2.1. Producción de guayacol	26
1.4.2.2.2. Producción 2,4,6-tricloroanisol (TCA)	27
<b>2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO</b>	30
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	33
<b>3.1. EVALUACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS PARA EL CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS TAPONES DE CORCHO</b>	33
3.1.1. PREPARACIÓN DE TAPONES CONTROL	33
3.1.1.1. Microorganismos utilizados	33
3.1.1.2. Tapones de corcho	34
3.1.1.3. Suspensiones de conidios fúngicos, levaduras y bacterias	34
3.1.1.3.1. Suspensiones de conidios fúngicos y levaduras	34
3.1.1.3.2. Suspensiones de bacterias	35
3.1.1.4. Medios de cultivo	35
3.1.1.5. Inoculación de los tapones	36
3.1.1.5.1. Inoculación por aerosol	36
3.1.1.5.2. Inoculación por inmersión	36

<b>3.1.1.6. Recuento de microorganismos recuperados</b>	37
<b>3.1.2. EVALUACIÓN DE LOS MÉTODOS UTILIZADOS PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LOS TAPONES DE CORCHO</b>	39
3.1.2.1. Inoculación de los tapones de corcho control	39
3.1.2.2. Ensayos realizados para evaluar el método de referencia	39
3.1.2.2.1. Prueba de las soluciones de lavado	40
3.1.2.2.2. Prueba de la velocidad de lavado	40
3.1.2.2.3. Prueba del tiempo de lavado	40
3.1.2.2.4. Prueba de los medios de cultivo	41
3.1.2.2.5. Prueba del tiempo de incubación	42
3.1.2.2.6. Prueba de la temperatura de incubación	42
3.1.2.3. Cálculo de las UFC/tapón	42
3.1.2.4. Comparación de metodologías	43
3.1.2.4.1. Norma ISO 10718:1993	43
3.1.2.4.2. Método de las diluciones decimales seriadas	44
3.1.2.4.3. Método del Sistema Miliflex-100®	44
3.1.2.4.4. Método aplicado a diferentes tapones de corcho	45
<b>3.2. RECUENTO, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS EN MUESTRAS DE TAPONES DE CORCHO</b>	45
3.2.1. Muestras de tapones de corcho	45
3.2.2. Procesado de las muestras	45
3.2.3. Aislamientos de hongos filamentosos, levaduras y bacterias	46
3.2.4. Identificación de los microorganismos aislados	46
3.2.4.1. Identificación de hongos filamentosos	46
3.2.4.2. Identificación de levaduras	46
3.2.4.3. Identificación de bacterias	47
<b>3.3. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS</b>	48
3.3.1. Suspensiones de microorganismos	48
3.3.2. Actividad enzimática	48
<b>3.4. ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS</b>	49
3.4.1. Método de los discos	49
3.4.2. Cromatografía en capa fina	50
<b>3.5. METABOLISMO SECUNDARIO DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS</b>	51
3.5.1. Producción de micotoxinas	51
<b>3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	53
<b>4. RESULTADOS</b>	55

<b>4.1. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS PARA EL CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS TAPONES DE CORCHO</b>	<b>55</b>
<b>4.1.1. PREPARACIÓN DE LOS TAPONES CONTROL</b>	<b>55</b>
4.1.1.1. Inoculación de tapones control por aerosol	55
4.1.1.2. Inoculación de tapones control por inmersión	55
4.1.1.3. Resultados del análisis estadístico en la preparación de los tapones de corcho control	66
<b>4.1.2. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS UTILIZADAS</b>	<b>70</b>
<b>4.1.2.1. Ensayos realizados para evaluar el método de referencia</b>	<b>70</b>
4.1.2.1.1. Prueba de las soluciones de lavado	70
4.1.2.1.2. Prueba de la velocidad de lavado	73
4.1.2.1.3. Prueba del tiempo de lavado	75
4.1.2.1.4. Prueba de los medios de cultivo	79
4.1.2.1.5. Prueba del tiempo de incubación	80
4.1.2.1.6. Prueba de la temperatura de incubación	83
<b>4.1.2.2. Resultados del análisis estadístico en la evaluación de la metodología para el control microbiológico de los tapones de corcho para vinos</b>	<b>86</b>
<b>4.1.3. RESULTADOS DE LA COMPARACIÓN DE METODOLOGÍAS</b>	<b>89</b>
4.1.3.1. Comparación de la metodología establecida por la Norma 0.20/95 y la metodología propuesta en este estudio	89
4.1.3.2. Comparación de la metodología establecida por la Norma ISO 10718:1993 y la metodología propuesta en este estudio	89
4.1.3.3. Comparación del método de las diluciones decimales seriadas y la metodología propuesta en este estudio	90
4.1.3.4. Comparación del método Sistema Miliflex-100® y la metodología propuesta en este estudio	90
4.1.3.5. Metodología propuesta aplicada a diferentes tapones de corcho	91
<b>4.2. RESULTADOS DEL RECuento E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS, LEVADURAS Y BACTERIAS EN MUESTRAS DE TAPONES DE CORCHO PARA VINOS TRANQUILOS Y VINOS ESPUMOSOS</b>	<b>92</b>
<b>4.2.1. RESULTADOS DEL RECuento DE HONGOS FILAMENTOSOS, LEVADURAS Y BACTERIAS EN MUESTRAS DE TAPONES DE CORCHO PARA VINOS ESPUMOSOS Y VINOS TRANQUILOS</b>	<b>92</b>
<b>4.2.2. RESULTADOS DE LA IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS, LEVADURAS Y BACTERIAS</b>	<b>93</b>
<b>4.3. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS</b>	<b>95</b>

<b>4.4. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS</b>	99
<b>4.4.1. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LOS HONGOS FILAMENTOSOS Y LEVADURAS AISLADAS</b>	99
<b>4.4.2. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LAS BACTERIAS AISLADAS</b>	114
<b>4.5. RESULTADOS DE LA CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA</b>	122
<b>4.6. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LAS FRACCIONES DE LOS HONGOS FILAMENTOSOS AISLADOS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA</b>	125
<b>4.7. RESULTADOS DEL ESTUDIO DEL METABOLISMO SECUNDARIO DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS</b>	126
<b>4.7.1. RESULTADOS DE LA PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS</b>	126
<b>4.7.1.1. Resultados de la producción de micotoxinas de <i>Alternaria alternata</i></b>	126
<b>4.7.1.2. Resultados de la producción de micotoxinas de <i>Penicillium citrinum</i>, <i>Fusarium moniliforme</i> y <i>Fusarium solani</i></b>	129
<b>5. DISCUSIÓN</b>	131
<b>5.1. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS PARA EL CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS TAPONES DE CORCHO</b>	131
<b>5.1.1. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA PREPARACIÓN DE LOS TAPONES CONTROL</b>	131
<b>5.1.1.1. Discusión de los resultados de la inoculación de los tapones control por aerosol</b>	131
<b>5.1.1.2. Discusión de los resultados de la inoculación de los tapones control por inmesión</b>	132
<b>5.1.2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DEL MÉTODO DE REFERENCIA</b>	135
<b>5.1.2.1. Prueba de las soluciones de lavado</b>	135
<b>5.1.2.2. Prueba de la velocidad de lavado</b>	135
<b>5.1.2.3. Prueba del tiempo de lavado</b>	136
<b>5.1.2.4. Prueba de los medios de cultivo</b>	136
<b>5.1.2.5. Prueba del tiempo de incubación</b>	137
<b>5.1.2.6. Prueba de la temperatura de incubación</b>	137
<b>5.1.2.7. Resumen de los resultados de la evaluación del método de referencia</b>	138
<b>5.1.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA COMPARACIÓN DE METODOLOGÍAS</b>	138

5.1.3.1. Comparación de la metodología establecida por la Norma 0.20/95 y la metodología propuesta en este estudio	138
5.1.3.2. Comparación de la metodología establecida por la Norma ISO 10718:1993 y la metodología propuesta en este estudio	139
5.1.3.3. Comparación del método de las diluciones decimales seriadas y la metodología propuesta en este estudio	140
5.1.3.4. Comparación del método Miliflex-100® y la metodología propuesta en este estudio	140
5.1.4.5. La metodología propuesta aplicada a diferentes tipos de tapones de corcho	140
<b>5.2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DEL RECUENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS EN MUESTRAS DE TAPAONES DE CORCHO PARA VINOS ESPUMOSOS Y VINOS TRANQUILOS</b>	141
5.2.1. RECUENTO DE HONGOS FILAMENTOSOS, LEVADURAS Y BACTERIAS EN LAS MUESTRAS DE TAPONES DE CORCHO	141
5.2.2. IDENTIFICACIÓN HONGOS FILAMENTOSOS, LEVADURAS Y BACTERIAS	142
<b>5.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD METABÓLICA DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS</b>	145
5.3.1. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS	145
5.3.1.1. Actividad enzimática de los hongos filamentosos y levaduras aisladas	145
5.3.1.2. Actividad enzimática de las bacterias aisladas	146
5.3.2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS	147
5.3.2.1. Actividad inhibitoria de los hongos filamentosos y levaduras aisladas	147
5.3.2.2. Actividad inhibitoria de las bacterias aisladas	149
5.3.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE LAS CROMATOGRAFÍAS EN CAPA FINA	149
5.3.3.1. Actividad inhibitoria de las fracciones de los hongos filamentosos obtenidas por cromatografía en capa fina	150
5.3.4. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS	151
5.3.4.1. Producción de micotoxinas por <i>Alternaria alternata</i>	151
5.3.4.2. Producción de micotoxinas por <i>Penicillium citrinum</i> , <i>Fusarium moniliforme</i> y <i>Fusarium solani</i>	152
<b>CONCLUSIONES</b>	154
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	157