

1. INTRODUCCIÓN

Desde épocas remotas el hombre ha empleado el corcho con diversos fines: Recubrimiento de paredes, materia prima para calzado, etc. Sin embargo, tradicionalmente, el corcho ha sido utilizado en forma de tapón, como sistema de cierre de botellas, especialmente de botellas de vino, ya que sus constituyentes le confieren condiciones de elasticidad, impenetrabilidad a los líquidos e inalterabilidad indispensables para preservar la calidad de los vinos (Cano 1995, Grilli 1996).

1.1. CARACTERÍSTICAS DEL CORCHO

Las células del corcho forman un tejido tegumentario de 20 a 50 mm de espesor en los troncos del *Quercus suber*, conocido con el nombre común de alcornoque. Esa especie arbórea, perteneciente a la familia de las *Fagaceae*, es típica del mediterráneo occidental y tiene importancia por la producción de corcho y en la formación de bosques (Gola *et al* 1965, Riboulet 1982).

El corcho se caracteriza por estar formado de células poliédricas, vacías en su interior (aproximadamente el 80 % del volumen tisular está representado por gas), estrechamente ligadas unas a otras, las cuales componen el tejido suberoso. Este tejido posee una estructura discontinua debido a la presencia de lenticelas (poros) que atraviesan radialmente la masa de suber en todo su grosor. Las lenticelas son permeables a gases y líquidos y permiten regularizar los intercambios gaseosos entre los tejidos vivos del tronco y el medio exterior (Riboulet 1982).

En la Figura 1, se ilustra un corte de tejido suberoso

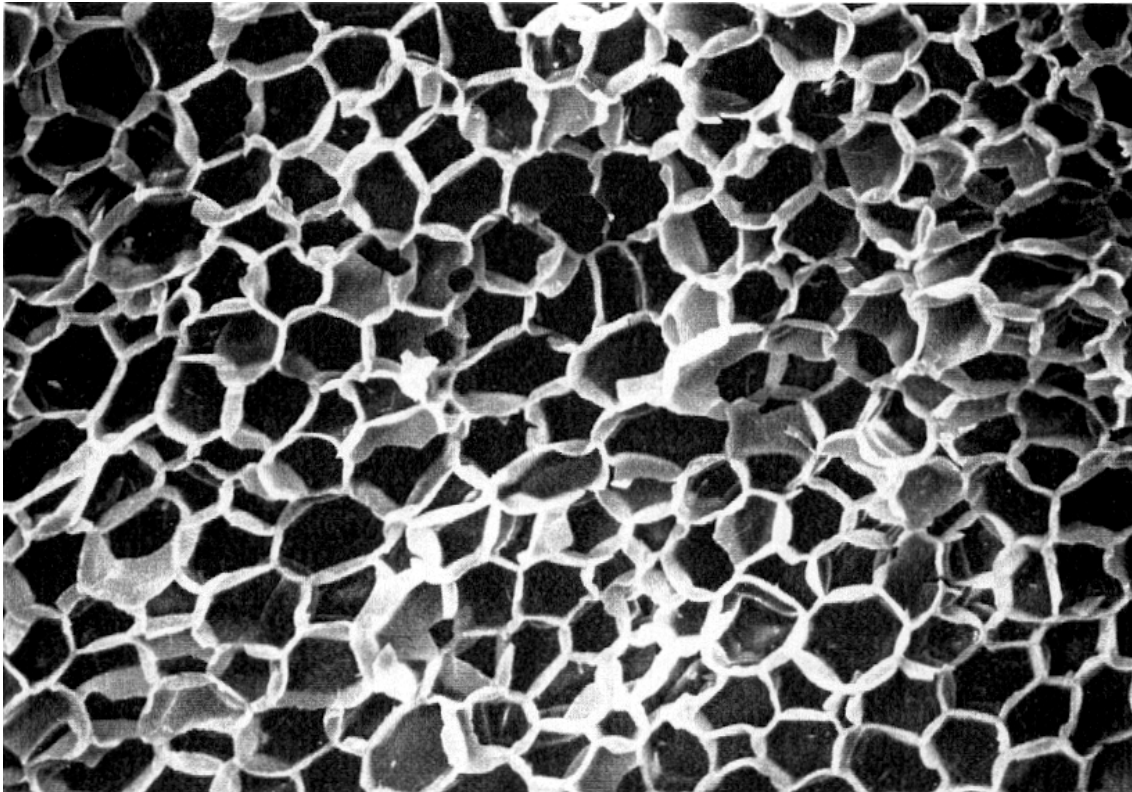


Figura 1. Corte transversal del tejido suberoso. (Calvo *et al* 1995)

Junto a estas características, la constitución química del tejido suberoso, le confiere propiedades al corcho, que lo hacen muy valorado para su uso con fines enológicos.

A continuación se detalla la constitución química y las propiedades físicas del corcho.

1.1.1. Constitución química

Diversos autores han descrito la constitución química de las células del *Quercus suber* y de otras especies de *Quercus*, entre ellos se pueden citar a Colagrande en 1996, Grilli en 1996, Masson en 1996, Navascués en 1998 y Riboulet en 1982.

Estos autores indican que los principales constituyentes de la célula del corcho y el porcentaje aproximado que representan son:

- Suberina	45 %
- Lignina	27 %
- Celulosa y polisacáridos	12 %
- Taninos	6 %
- Ceroides	5 %
- Otros constituyentes (minerales, agua, glicerina)	6 %

- **Suberina**: Es un poliéster de alto peso molecular, formado por policondensación de diversos ácidos – alcoholes. Sus principales componentes son ácidos grasos de cadena larga (ácido felúrico, ácido esteárico y ácido felónico), alcoholes y oxiácidos. La suberina le confiere el carácter hidrófobo a la célula del corcho, además protege a la célula de patógenos, evita la evaporación de agua, interviene en la cicatrización de heridas y actúa como órgano de excreción.
- **Lignina**: Es un polímero de elevado peso molecular compuesto de alcoholes aromáticos, principalmente el alcohol coniferílico, alcohol sinapílico y alcohol p-hidroxicinámico. La lignina se encuentra insertada en las fibras de celulosa. Su función es conferir rigidez e impermeabilidad a la membrana celular.
- **Celulosa**: Es un polímero homogéneo y lineal de moléculas de glucosa, cuyo núcleo fundamental es la diglucopiranososa, denominado celobiosa. La celulosa forma microfibrillas rígidas debido a los enlaces de hidrógeno entre las glucosas de una misma cadena y de cadenas vecinas. Le confiere resistencia al estiramiento.
- **Taninos**: Son sustancias polifenólicas, formadas por el catecol, orcinol y ácido gálico, se unen a las proteínas volviéndolas insolubles e imputrescibles.

- **Ceroides**: Son ésteres de ácidos grasos con alcoholes de cadena larga, compuestos principalmente por la cerina, ácido betulico y betulina. Los ceroides son los responsables de la impermeabilidad del corcho.

- **Otros constituyentes**
 - **Materias minerales**: Están representados por sodio, potasio, magnesio, aluminio, hierro, manganeso, silicio, fósforo, bario, estroncio y trazas de litio, cobre, cromo y titanio.

 - **Agua**: Representa entre el 3 y el 10 %, dependiendo de las condiciones de almacenamiento.

 - **Glicerina**: Forma parte de la suberina y su porcentaje varía de acuerdo a la edad del árbol.

1.1.2. Propiedades físicas

- **Densidad**: Varía entre 0,13 y 0,25; a medida que aumenta la densidad disminuye la calidad del corcho.

- **Impermeabilidad**: El corcho se considera impermeable, sin embargo, se trata de una impermeabilidad no absoluta ya que deja fluir lentamente el gas debido al contenido gaseoso de las células. Así mismo, se observa el trasiego de ciertos elementos desde el tapón al vino y viceversa, lo cual puede ser ocasionado por diálisis o por perforaciones provocadas por microorganismos.

- **Adherencia**: Posee un alto coeficiente de fricción atribuido al hecho de que el corcho en contacto con una superficie lisa presenta un gran número de ventosas constituidas por las cavidades de las células que se encuentran en la superficie cortada del corcho.

- **Compresibilidad y elasticidad**: Estas propiedades del corcho dependen del porcentaje de hidratación del mismo y de su temperatura, los cuales dependen a su

vez, de la forma de las células, el espesor de las paredes celulares y a la composición de las mismas. La compresibilidad y elasticidad del corcho se debe al deslizamiento entre las capas de suberina y de cerina.

1.2. PROCESO DE PRODUCCIÓN DE LOS TAPONES DE CORCHO

La producción del corcho depende de algunos factores como es la genética del árbol, factores ambientales y de los cultivos (Grilli 1996).

En cuanto a la genética del *Quercus suber*, se debe destacar que el árbol se caracteriza por un marcado polimorfismo y variabilidad natural como condición para perpetuar la especie, lo que se encuentra ligado a la calidad óptima del corcho (Azzena *et al* 1996, Dettori *et al* 1996, Muroli 1996).

Así mismo, factores ambientales como la pluviosidad y la temperatura influyen directamente sobre el crecimiento del árbol y como consecuencia en la calidad, calibre y propiedades mecánicas (elasticidad, resistencia a la compresión y torsión) del corcho (Molina y Caritat 1996).

La subericultura es una práctica forestal que se ha convertido en un importante factor de desarrollo para la zona del mediterráneo occidental, debido a su valor productivo y paisajístico. A través de ella se obtiene la corteza del árbol en pie, lo que la hace una práctica muy valorada y única en su género (Pintus *et al* 1996).

La producción mundial de corcho es de aproximadamente 300000 toneladas por año, de los cuales Portugal produce el 55 %, España el 28 %, Argelia el 6 %, Marruecos el 4 %, Italia el 3 %, Túnez el 3 % y Francia el 1 % (Mazzoleni *et al* 1994). En España, particularmente en Catalunya, la industria corchera es de relevante importancia, fundamentalmente la elaboradora de tapones de corcho para vinos tranquilos y vinos espumosos.

1.2.1. Proceso de producción de tapones de corcho para vinos tranquilos

El proceso de producción de los tapones de corcho para vinos tranquilos comprende de forma general, las siguientes fases:

- **Descortización del árbol:** Este proceso depende de la edad del árbol, de la fase vegetativa y de la estación climática. La explotación se inicia cuando el árbol tiene entre 25 a 30 años, se obtiene un producto de tejido complejo y composición variada, que no puede ser utilizado con fines enológicos. Alcanzado este tiempo, la obtención del corcho con aplicación en la industria enológica se logrará al cabo de 9 a 10 años.
- **Almacenamiento al aire libre (estacionamiento y cura):** Las planchas de corcho son colocadas a la intemperie con la finalidad de transformar las sales minerales y taninos que pueden alterar las propiedades del corcho. Este período puede durar de 1 a 3 años.
- **Proceso de ebullición:** Las planchas de corcho se introducen en agua caliente con el objeto de eliminar las sales minerales y taninos y recuperar las condiciones de elasticidad y hermeticidad característicos del producto. Posteriormente, las planchas se dejan secar en espacios ventilados.
- **Fabricación de los tapones:** En primer lugar, las planchas son cortadas mecánicamente según la longitud deseada, luego se perforan por medio de un taladro, obteniéndose el tapón en bruto; el cual es dimensionado de acuerdo a la demanda del mercado. Los tapones fabricados serán clasificados y se separarán de los defectuosos, este proceso se lleva a cabo de forma manual y mecánica, por medio de sistemas de tratamiento de imágenes.
- **Lavado de los tapones:** Esta operación se realiza con la finalidad de eliminar o disminuir la presencia de microorganismos, polvo, sales minerales y taninos. El lavado (Carvalho *et al* 1995, Gallo 1996) puede realizarse con:
 - **Hipoclorito de sodio o dicloruro de calcio:** Con una posterior neutralización con ácido oxálico; se hace necesario en este caso un lavado con agua para evitar la presencia de residuos en el tapón terminado

- Peróxido de hidrógeno: El uso de agua oxigenada en el lavado de los tapones tiene el inconveniente de dejar residuos en los tapones acabados.
- Productos ácidos: Los tapones son desinfectados con sustancias ácidas que solubilicen los taninos o polifenoles.
- **Marcado**: El marcado e identificación de los tapones se realiza con fuego o con tinta según su destino y de acuerdo a las exigencias de los compradores.
- **Tratamiento de acabado**: Los tratamientos (Gallo 1996) a los que se someten los tapones de corcho para ser comercializados, de manera que mejore la calidad técnica y la estética de los mismos son:
 - Colmatado: Los tapones de baja calidad son tratados con polvo de corcho mezclado con caucho disuelto en hexano, en solventes acuosos (todavía su uso industrial no es muy difundido) o en solventes con alto punto de inflamabilidad (ofrecen mayor seguridad que el hexano).
 - Revestimiento: Se revisten los tapones con productos que evitan la salida de los líquidos a través de ellos y además mejoran su aspecto. Estos productos pueden estar compuestos por: Caucho con solventes varios o polímeros de butadieno en solventes acuosos.
 - Tratamiento de superficie: Los tapones son sometidos a tratamiento con compuestos químicos que faciliten el taponado de las botellas, entre ellos se encuentran la parafina y la silicona.
- **Control de calidad**: Se realiza una verificación final de las características (dimensiones), propiedades (humedad, densidad, capacidad de expansión, de compresión y capilaridad) y un análisis microbiológico de los tapones acabados.

1.2.2. Producción de tapones para vinos espumosos

En el proceso de producción de los tapones de corcho para vinos espumosos se utiliza un grueso serrín de corcho, el cual se aglomera con cola elaborada a base de poliuretano, para fabricar el mango del tapón, éste tiene por finalidad obstruir la red de canalículos o lenticelas característicos del tejido suberoso. A este mango de aglomerado se le colocan dos o tres arandelas extraídas de corcho natural pegadas entre sí, en uno de los extremos del mango. Las colas utilizadas para pegar las arandelas están elaboradas a base de caseína o poliuretano (autorizadas para el contacto alimentario). Las arandelas o discos evitan que el vino tenga contacto con el material aglomerado.

Este sistema le confiere hermeticidad al tapón, impidiendo el intercambio gaseoso con el exterior y al mismo tiempo mantiene las características del corcho natural (Cano 1995, Juanola 1995).

Posteriormente, el tapón es dimensionado y biselado según los requerimientos. Luego serán clasificados y marcados de la misma forma que los tapones para vinos tranquilos.

El control de calidad de estos tapones se realiza verificando sus dimensiones (diámetro, longitud, grosor de los discos, longitud y ángulo del bisel), peso, contenido de humedad, tensión de rotura por torsión, contenido de polvo y análisis microbiológico.

1.3. NORMALIZACIÓN Y CONTROL DE CALIDAD DE LOS TAPONES DE CORCHO

El tapón de corcho ideal será aquel que le proporcione la mayor estanqueidad e inercia química y organoléptica al vino, ya que siendo un material foráneo, puede ser fuente de contaminación. Por esto, la calidad del producto viene ligada a la calidad de la producción del corcho, de la preparación de las planchas, de la fabricación de los tapones y la comercialización (de Castro 1990, Riboulet 1992).

De esta forma, la industria debe elaborar un producto conforme a las disposiciones legales, de tal manera que asegure la calidad comercial del producto y evite las alteraciones microbianas que puedan incidir en la salud de los consumidores (Armendariz 1996, Bourgeois *et al* 1996).

1.3.1. Control de calidad microbiológico de los tapones de corcho

La contaminación microbiana de los alimentos ha sido un problema al que se ha enfrentado el hombre a través de su historia. Los conocimientos crecientes en técnicas de conservación de los alimentos, así como de los microorganismos presentes en ellos, de la fisiología y ecología de los mismos, han contribuido a garantizar alimentos inocuos y sanos para los consumidores (Adams y Moss 1997).

Uno de los fines más importantes del control de calidad de los alimentos es la determinación de microorganismos en los mismos que puedan alterar su elaboración, su valor alimenticio y comercial, evitando así, pérdidas económicas, o que puedan originar problemas sanitarios por producción de sustancias tóxicas o infecciones en los individuos que los consumen.

Estas razones obligan a las industrias a fabricar alimentos, los recipientes que los contienen o los materiales en contacto con ellos bajo estrictas normas legales de control de calidad (Lupien 1997, Mossel y Moreno 1985, Pascual 1992).

Diversas instituciones regionales e internacionales se encargan de establecer las metodologías analíticas a seguir por los fabricantes de estos productos para garantizar su calidad, entre ellos se debe mencionar la International Standardization Organization (ISO), la Comisión Internacional sobre Especificaciones Microbiológicas de los Alimentos (ICMSF) y las asociaciones de normalización y certificación regionales.

Específicamente, las disposiciones legales que controlan la calidad microbiológica de los tapones de corcho en los países europeos fabricantes de estos productos (Portugal, España, Francia e Italia) se elaboran tomando como referencia la Norma ISO 10718:1993 para los tapones de corcho destinados a tapar botellas de vino, en ellas se establecen los pasos a seguir para el análisis microbiológico de los mismos.

El análisis microbiológico establecido por estas Normas se refiere al recuento de las Unidades Formadoras de Colonia de hongos filamentosos, levaduras y bacterias presentes en la superficie de los tapones de corcho acabados y semielaborados, después de aplicar técnicas de extracción con soluciones isotónicas y filtración por membrana, las cuales son sembradas en medios de cultivo apropiados e incubadas en condiciones adecuadas para la recuperación de microorganismos.

En la actualidad los esfuerzos para controlar la calidad de los alimentos, se centran en la aplicación y optimización de las normas de control de calidad microbiológica y también en la aplicación de sistemas de análisis de riesgos e identificación y control de puntos críticos (A.R.I.C.P.C.), estos últimos son sistemas de control de calidad relacionados con la estructura organizacional, las responsabilidades, procedimientos y procesos aplicados a la industria alimentaria y en consecuencia a la industria elaboradora de tapones de corcho con fines enológicos (Gould *et al* 1995, ICMSF 1991, Pi *et al* 1996, Vanne *et al* 1996).

1.4. LA MICROBIOLOGÍA DEL CORCHO

La particular naturaleza del corcho permite la colonización y el mantenimiento de microorganismos en las lenticelas de sus células. Un cambio en la presión osmótica o una variación en la permeabilidad de la membrana celular influye principalmente en la calidad microbiológica de las planchas de corcho y como consecuencia también en los tapones de corcho producidos (Calvo *et al* 1993).

También se debe tener en cuenta que el corcho ya posee una microbiota natural que puede desarrollarse en el proceso de elaboración de los tapones, siendo de especial importancia el agua de lavado de las planchas y el almacenamiento de los tapones (Colagrande 1996, Calvo *et al* 1993, Danesh *et al* 1997).

Diversos autores han descrito la microbiota del corcho, entre ellos se pueden mencionar a Agut *et al* en 1996, Calvo y Agut en 1996, Calvo *et al* en 1993, Cantagrel y Vidal en 1990, Castera-Rossignol en 1983, Codina *et al* en 1993, Daily *et al* en 1984, Danesh *et al* en 1997, Falco y Sampo en 1993, Lefebvre *et al* en 1983, Moreau en 1978, Moreau *et al* en 1976 Riboulet en 1982, Rocha *et al* en 1996, Schaeffer *et al* en 1978 y Suárez *et al* en 1997. Estos investigadores han aislado de muestras de los alcornoques, de las planchas de corcho y de los tapones de corcho, numerosas especies de hongos filamentosos, levaduras y bacterias.

La diversidad fúngica está representada mayoritariamente por hongos filamentosos y levaduras pertenecientes a los *Deuteromycotina* y *Zigomycotina*.

Los *Deuteromycotina* se caracterizan por su micelio vegetativo septado y reproducción asexual formando conidios a partir de células especializadas. A ellos también pertenecen los *Blastomycetes*, que se caracterizan por poseer un soma formado por células en forma de levaduras con o sin pseudomicelio (Alexopoulos y Mims 1985). Todos pueden encontrarse en suelo, materia vegetal y animales (Brock y Madigan 1993).

Los *Zigomycotina* se caracterizan por poseer un micelio cenocítico, reproducción asexual por medio de conidios formados en esporangios y reproducción sexual produciendo zigosporas. La mayoría son saprófitos, aunque algunos pueden ser parásitos de plantas y animales (Casas 1989).

En la tabla 1, se enumeran los hongos filamentosos y levaduras aislados por los autores antes mencionados en árboles, planchas de corcho y tapones.

Tabla 1. Hongos filamentosos y levaduras que han sido aislados de árboles de alcornoque, planchas de corcho y tapones de corcho

Hongos Filamentosos			Levaduras
<i>Penicillium</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Monilia sitophila</i>	<i>Candida sp</i>
<i>P. frequentans</i>	<i>A. niger</i>	<i>Eurotium sp</i>	<i>Rhodotorula</i>
<i>P. multicolor</i>	<i>A. flavus</i>	<i>Acremonium strictum</i>	<i>R. candida</i>
<i>P. roqueforti</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>Mucor</i>	<i>R. glutinis</i>
<i>P. expansum</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>M. plumbeus</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>P. chrysogenum</i>	<i>A. terreus</i>	<i>M. hiemalis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
<i>P. citrinum</i>	<i>A. glaucus</i>	<i>M. racemosus</i>	<i>S. italicus</i>
<i>P. decumbens</i>	<i>A. parasiticus</i>	<i>Rhizopus arrhizus</i>	<i>S. heterogenicus</i>
<i>P. meleagrinum</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>Paecilomyces variotii</i>	<i>S. rouxii</i>
<i>P. variable</i>	<i>A. versicolor</i>	<i>Neurospora sp</i>	<i>S. ludwigii</i>
<i>P. viridicatum</i>	<i>A. ruber</i>	<i>Phoma sp</i>	<i>Cryptococcus sp</i>
<i>P. citreoviride</i>	<i>A. conicus</i>	<i>Alternaria sp</i>	<i>Trichosporon pullulans</i>
<i>P. echinulatum</i>	<i>Trichoderma</i>	<i>Acremonium sp</i>	
<i>P. granulatum</i>	<i>T. hamatum</i>	<i>Cladosporium</i>	
<i>P. purpurescens</i>	<i>T. longibrachiatum</i>	<i>C. cladosporioides</i>	
<i>P. simplicissimum</i>	<i>T. viride</i>	<i>C. herbarum</i>	
<i>P. brevicompactum</i>	<i>Armillaria mellea</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	

En comparación con las numerosas descripciones de la microflora del corcho, el aislamiento e identificación de bacterias en este sustrato ha sido poco señalado en la bibliografía.

Sin embargo, Calvo y Agut en 1996, Calvo *et al* en 1993 y Riboulet en 1982, indican la presencia de bacterias en los árboles, planchas y tapones de corcho semielaborados y acabados. Los géneros bacterianos identificados por ellos, incluyen especies con

diversas características morfológicas y fisiológicas con importancia en la microbiología de los alimentos.

Las bacterias aisladas por los autores antes mencionados, se indican en la tabla 2.

Tabla 2. Bacterias que han sido aisladas de árboles de alcornoque, planchas y tapones de corcho.

Bacterias	
<i>Bacillus</i>	<i>Micrococcus</i>
<i>B. cereus</i>	<i>M. luteus</i>
<i>B. firmus</i>	<i>M. lylae</i>
<i>B. circulans</i>	<i>Nocardia sp</i>
<i>B. sedentarius</i>	<i>Pseudomonas sp</i>
<i>Corynebacterium sp</i>	<i>Streptomyces sp</i>
<i>Flavobacterium sp</i>	<i>Listeria sp</i>
<i>Kurthia sp</i>	

1.4.1. Acción de los microorganismos en el corcho

Algunas especies de los microorganismos mencionados son capaces de atacar directamente el corcho o producir metabolitos que pueden afectar la calidad de los tapones, los vinos en contacto con ellos o la salud de los consumidores.

Como ya se ha mencionado, la estructura del corcho favorece la presencia de microorganismos en las lenticelas o canalículos, especialmente los hongos filamentosos pueden ejercer una acción degradativa en este sustrato.

Calvo *et al* en 1993, Calvo *et al* en 1995 y Rocha *et al* en 1995, demuestran en sus estudios, a través de microscopía óptica y microscopía electrónica, las modificaciones en la estructura del tejido vegetal, producidas por *Armillaria mellea* (produce la mancha amarilla en el *Quercus suber*) y especies de *Penicillium* (Figura 2). Específicamente, Rocha *et al* 1996, demuestra que los hongos filamentosos desarrollados en las lenticelas utilizan principalmente los polisacáridos y compuestos fenólicos de este sustrato.

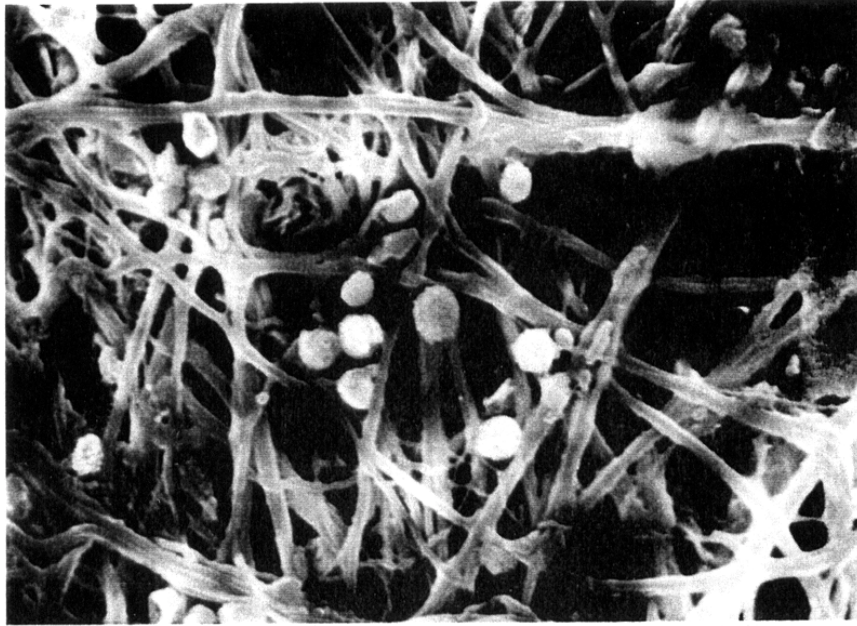


Figura 2. Presencia de hifas y conidios en corcho alterado (Calvo *et al* 1995)

A continuación se especifican algunas actividades metabólicas de los principales géneros microbianos que pueden influir en la calidad microbiológica de los tapones de corcho para vinos.

1.4.1.1. Actividad enzimática de los microorganismos

Las enzimas extracelulares producidas por los microorganismos pueden digerir materiales nutrientes insolubles y los productos de la digestión son transportados al interior de la célula, donde se utilizan como nutrientes para el crecimiento (Brock y Madigan 1993).

Como ya se indicó, los principales constituyentes de la pared celular del corcho son la celulosa, la lignina y la suberina y los microorganismos que conforman la microbiota del corcho, principalmente los hongos filamentosos pertenecientes a los géneros *Penicillium*, *Aspergillus* y *Trichoderma*, están descritos como productores de enzimas que juegan un papel importante en la descomposición microbiológica de materias orgánicas (Rocha *et al* 1996).

La actividad enzimática de tipo celulolítica y lignolítica ha sido estudiada por numerosos autores, entre ellos se puede citar a Balcao *et al* en 1996, Beldman *et al* 1985, Christov y Prior en 1993, Chikmatsu *et al* en 1999, Hass *et al* en 1993 y Santosh *et al* en 1999. Ellos indican la acción degradativa que ejercen las enzimas de origen microbiano sobre la celulosa, la lignina y otros componentes de las paredes celulares vegetales.

Las enzimas que intervienen en la degradación de la celulosa, la hemicelulosa y la lignina se pueden dividir en tres grupos (Kent 1983, Leonowicz *et al* 1999):

- El primer grupo comprende las enzimas que atacan directamente a los compuestos antes mencionados: Es así como la celulosa es degradada por la celulasa, la cual es un complejo enzimático formado por: endo-1,4- β -glucanasas, dos tipos de exo-1,4- β -glucanasas (celobiohidrolasa y glucohidrolasa) y β -glucosidasa. La hidrólisis completa de la hemicelulosa es realizada por la endo-1,4- β -manasa, β -manosidasa, β -glucosidasa y α -galactosidasa. La degradación de la lignina es llevada a cabo por ligninasas y dioxigenasas.
- El segundo grupo incluye la superóxido dismutasa y la glioxaloxidasa. Estas enzimas cooperan con el primer grupo y no actúan por sí solas.
- El tercer grupo está compuesto por la glucosa 1-oxidasa, aril alcohol oxidasa, celobiosa quinona oxidoreductasa y celobiosa deshidrogenasa. Estas enzimas pueden actuar separadamente o cooperando unas con otras.

Las propiedades de estas enzimas se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Propiedades de algunas enzimas que actúan en la degradación de la lignina y la celulosa (Leonowicz *et al* 1999)

Enzima	Reacción
Endo-1,4- β -glucanasa	Endohidrólisis de enlaces 1,4- β -D-glucósidos
Exo-1,4- β -glucanasa	
• Celobiohidrolasa	Hidrólisis de enlaces 1,4- β -D-glucósidos liberando celobiosa
• Glucohidrolasa	Hidrólisis de enlaces 1,4- β -D-glucósidos liberando glucosa
β -glucosidasa	Hidrólisis de β -D-glucosa
Endo-1,4- β -manasa	Hidrólisis al azar de enlaces 1,4- β -manósidos
β -manosidasa	Hidrólisis de residuos de β -D-manosa
α -galactosidasa	Hidrólisis de residuos de α -D-galactosa en α -D-galactósidos
Ligninasas	Catálisis de varias reacciones de oxidación, corte de la cadena de lignina, Corte de anillos aromáticos, oxidación de Bencil alcoholes a aldehídos
Superóxido dismutasa	Fisión de anillos aromáticos, desmetilación, producción de peróxido de hidrógeno y oxígeno.

Otras enzimas producidas por hongos filamentosos, levaduras y bacterias, como son las fosfatasas (fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina) juegan un papel importante en la fisiología y patogenicidad de estos microorganismos, ya que son secretadas para remover el fosfato de substratos orgánicos cuando se encuentran bajo condiciones limitadas de fosfato; especialmente las fosfatasas ácidas actúan como “buscadoras” de compuestos fosforilados a fin de introducirlos en sus células, lo que ha sido asociado con la capacidad de patogenicidad de un gran número de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Colón *et al* 1992, Hass *et al* 1992).

1.4.2. Metabolismo secundario

El metabolismo secundario puede considerarse como aquellos procesos metabólicos que tienen lugar durante la fase estacionaria, después de que ya ha terminado el crecimiento de biomasa. En determinadas condiciones de crecimiento, diversos microorganismos pueden formar, a través de vías biosintéticas específicas, grandes cantidades de algunos productos que no tienen función estructural ni de reserva (Agut 1993, Parés y Juárez 1997).

En el metabolismo secundario se distinguen dos fases denominadas trofofase e ideofase. La trofofase se caracteriza por la producción de biomasa o proliferación celular y la ideofase por la producción de metabolitos secundarios una vez que ha cesado el crecimiento celular (Bu'Lock 1965).

La biosíntesis de los metabolitos secundarios se produce a partir de productos intermediarios del metabolismo primario, dependiendo de las condiciones de crecimiento de los microorganismos, ésto quiere decir, que los dos tipos de metabolismo se encuentran relacionados (Brock y Madigan 1993).

Como ejemplo de ello, se puede indicar que diversas enzimas que participan en la formación de metabolitos secundarios son reprimidas por la presencia de nutrientes en el medio, como carbono, nitrógeno o fósforo, durante la fase exponencial de crecimiento; en cambio, el agotamiento de los nutrientes en el medio induce al cese del crecimiento y finalmente a la producción del metabolito secundario (Agut 1993).

Otro indicio de esta relación, radica en que algunos metabolitos secundarios se producen por ramificaciones de vías biosintéticas primarias, las cuales se inician al no sintetizarse más el metabolito primario. Así mismo, la presencia de algunos metales como manganeso, hierro y zinc inducen la producción de metabolitos secundarios de bacterias y hongos (Parés y Juárez 1997).

Según Demain y Piret en 1981, Madigan *et al* en 1998 y Parés y Juárez en 1997, los metabolitos secundarios son moléculas orgánicas complejas, que poseen la siguientes características:

- Son productos naturales, elaborados por grupos microbianos específicos, incluso en muchos casos son característicos sólo de cepas pertenecientes a ciertas especies.
- Generalmente se sintetizan como una mezcla de compuestos químicos que presentan una gran diversidad estructural; por ejemplo: Alcaloides, policétidos, benzoquinonas, flavonoides, glucósidos, tetraciclinas, cumarinas, aminoazúcares, macrólidos, salicilatos, etc.
- Aparentemente no se encuentran relacionados con los procesos de las vías biosintéticas cuyos productos son subunidades y coenzimas o con la formación de macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos y polímeros.
- En su mayoría son excretados al exterior de la célula, lo que puede estar relacionado con la eliminación de material tóxico o con una función propia de estas moléculas.

Los autores citados anteriormente indican que la función de los metabolitos secundarios puede estar relacionada con:

- La producción de componentes estructurales de la célula (estructuras de cubiertas celulares fúngicas).
- La captación de minerales (quelantes de hierro indispensables para otros microorganismos, lo que los hace más competitivos).

- La formación de señales de diferenciación (esporulación y acumulación de productos de reserva).
- La producción de elementos que contribuyen a la colonización (antibióticos y toxinas).

La actividad antimicrobiana de los microorganismos que producen antibióticos se centra en su capacidad para inhibir procesos metabólicos primarios esenciales de otros microorganismos. Generalmente actúan uniéndose a las enzimas, orgánulos celulares de otros microorganismos debido a la similitud con el metabolito primario y de esta forma interfieren con el proceso vital. Esta característica evidencia la tolerancia de los microorganismos productores a los efectos tóxicos de estos compuestos (Paréz y Juárez 1997).

1.4.2.1. Producción de micotoxinas

Las micotoxinas son un grupo de metabolitos secundarios fúngicos formados por series de reacciones consecutivas catalizadas por enzimas a partir de intermediarios bioquímicamente simples del metabolismo primario, como: acetato, malonato y ciertos aminoácidos. Las principales vías biosintéticas incluyen condensación, oxidación/reducción, alcalización y halogenación los cuales producen una gran variedad de compuestos secundarios tóxicos (Smith y Hacking 1983).

Las micotoxinas producidas por algunos hongos filamentosos pueden contaminar alimentos, piensos para animales o las materias primas para su fabricación y producir micotoxicosis en el hombre y animales (Moss 1994).

Los géneros de hongos filamentosos micotoxigénicos están representados principalmente por *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, pero también tienen importancia *Trichoderma*, *Trichothecium* y *Alternaria* como contaminantes de alimentos o patógenos de plantas, entre otros (Adams y Moss 1997).

Entre la diversidad de micotoxinas descritas hasta el presente, mencionaremos tan sólo aquellas directamente relacionadas con los géneros implicados en nuestro estudio.

1.4.2.1.1. Micotoxinas de *Aspergillus*

Aspergillus flavus es el principal productor de las aflatoxinas, aunque otras especies de *Aspergillus* pueden elaborar esta micotoxina, entre ellos: *A. niger*, *A. parasiticus* y *A. ochraceus*, así como algunas especies de *Penicillium*. Las aflatoxinas se dividen según los colores fluorescentes (azul o verde) que producen bajo luz ultravioleta cuando son separadas por técnicas de cromatografía en capa fina, en B₁, B₂, G₁ y G₂, siendo la más importante la aflatoxina B₁, ya que son conocidas sus propiedades carcinogénicas y hepatotóxicas en animales y en el hombre (Adams y Moss 1997, Jayaraman y Kalyanasundaran 1994).

También se debe mencionar la ocratoxina A, producida por *A. ochraceus* y *P. verrucosum*, la cual produce daño en el hígado y riñones, además tiene propiedades inmunodepresivas en animales de experimentación. Esta micotoxinas pueden aparecer en cereales y sus derivados, legumbres, diversas frutas y vinos (Casas 1989, Zimmerli y Dick 1996).

1.4.2.1.2. Micotoxinas de *Penicillium*

Como ya se mencionó *P. verrucosum* produce la ocratoxina A y *P. expansum* (patógeno de frutas) produce patulina, la cual tiene efecto sobre la respuesta inmunitaria, sobre el sistema nervioso y sobre el aparato digestivo (Sweeney y Dobson 1998).

La citrinina es producida por *P. citrinum*, aunque también puede ser producida por *P. expansum* y *P. verrucosum* y algunas especies de *Aspergillus*. Se trata de una quinona, con un potente efecto antibacteriano, pero tóxica (nefrotóxica) para el hombre y los animales. Es contaminante de cereales, tales como: Trigo, maíz, arroz, cebada y avena (Montani *et al* 1988, Franco *et al* 1996).

1.4.2.1.3. Micotoxinas de *Fusarium*

Varias especies de *Fusarium* y otros hongos filamentosos producen los tricotecenos. Se trata de un grupo diverso de micotoxinas, las cuales son terpenos cíclicos que causan la enfermedad conocida como aleukia tóxica alimentaria y se caracterizan por ser citotóxicos para las células de mamíferos e inmunotóxicos lo que hace que el hombre y otros animales se vuelvan susceptibles a otras infecciones microbianas (Sweeney y Dobson 1998).

Las fumonisinas son otro grupo importante de micotoxinas producidas por *Fusarium*, especialmente por *Fusarium moniliforme*. La más abundante en la naturaleza es la fumonisina B₁, la cual puede estar relacionada con cáncer esofágico en el hombre y también se ha demostrado que tiene poderes hepatotóxicos y hepatocancerígenos, además de ser nefrotóxicas, inmunodepresoras y embriotóxicas en animales de experimentación (Kenneth *et al* 1990, Nair 1998, Sweeney y Dobson 1999).

Estas micotoxinas son contaminantes de maíz natural o procesado (harinas), utilizado como alimento de animales o destinado al consumo humano (Dombrink-Kurtzmam y Dvorak 1999)

1.4.2.1.4. Micotoxinas de *Alternaria*

Alternaria es un hongo filamentosos cuyo hábitat es el suelo y se caracteriza por ser patógeno de plantas y causante de la contaminación de importante productos comerciales (pera, tabaco, patata, tomate y cítricos). Así mismo, es productor de micotoxinas en granos, arroz y maíz (Ramm *et al* 1994, Stack y Prival 1986). La contaminación de granos con metabolitos de especies de *Alternaria* puede estar relacionado con la incidencia de cáncer esofágico en ciertas regiones geográficas (Davis y Stack 1991)

Las micotoxinas producidas por *Alternaria* y específicamente por *A. alternata* son numerosos, las más ampliamente estudiadas han sido: El ácido tenuazoico (TA),

alternariol (AOH), alternariol monometil éter (AME), altenueno (ALT), altertoxina I y tentoxina (Griffin y Chu 1983, Orvehed *et al* 1988).

En la tabla 4, se ilustran algunas de las estructuras de las micotoxinas mencionadas anteriormente

Tabla 4. Estructura química de algunas micotoxinas producidas por hongos filamentosos

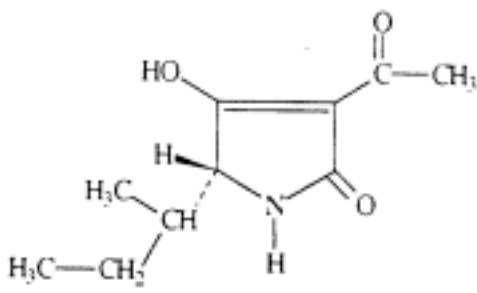
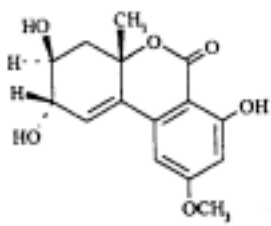
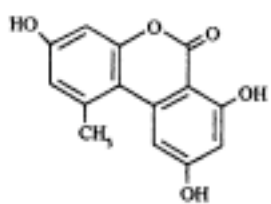
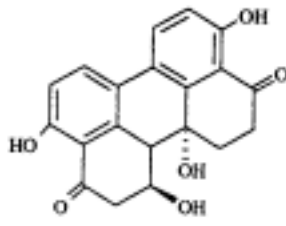
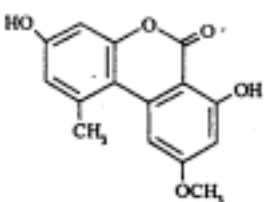
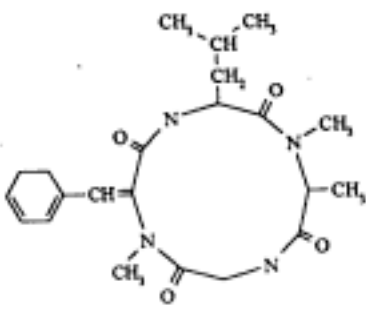
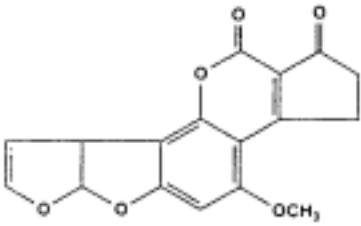
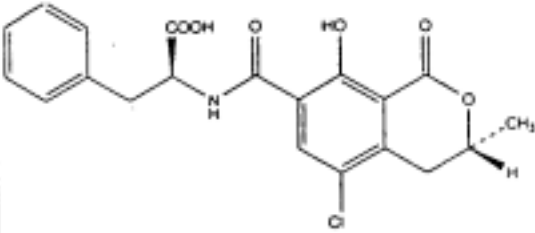
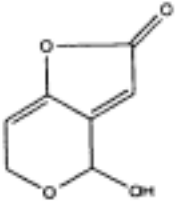
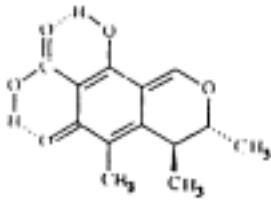
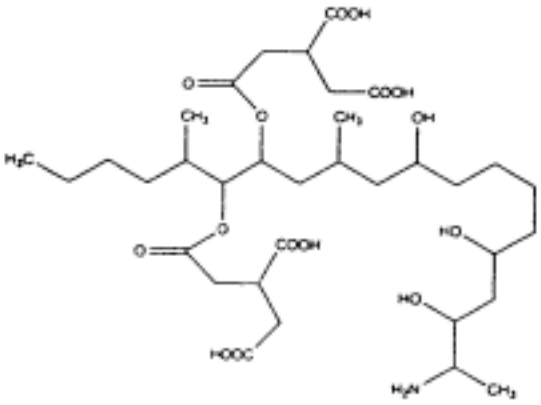
<p>Acido tenuazoico (TA)</p> 	<p>Altenueno (ALT)</p> 
<p>Alternariol (AOH)</p> 	<p>Altertoxina (ATX-I)</p> 
<p>Alternariol monometil éter (AME)</p> 	<p>Tentoxina (TEN)</p> 

Tabla 4. Continuación

<p>Aflatoxina B₁</p>  <p>The structure of Aflatoxina B₁ is a complex polycyclic molecule. It features a central benzene ring with a methoxy group (-OCH₃) at the 2-position. This benzene ring is fused to a five-membered furan ring on the left and a six-membered dihydroisocoumarin ring on the right. The dihydroisocoumarin ring has two carbonyl groups (=O) at the 3 and 4 positions.</p>	<p>Ocratoxina A</p>  <p>The structure of Ocratoxina A consists of a central benzene ring with a hydroxyl group (-OH) at the 1-position and a chlorine atom (-Cl) at the 4-position. This benzene ring is linked via an amide bond (-NH-CO-) to a side chain that includes a phenyl ring and a carboxylic acid group (-COOH). The benzene ring is also fused to a six-membered dihydroisocoumarin ring, which has a methoxy group (-OCH₃) at the 3-position and a hydrogen atom at the 4-position.</p>
<p>Patulina</p>  <p>The structure of Patulina is a bicyclic molecule. It consists of a six-membered ring fused to a five-membered ring. The six-membered ring has a hydroxyl group (-OH) at the 2-position. The five-membered ring has a carbonyl group (=O) at the 2-position.</p>	<p>Citrinina</p>  <p>The structure of Citrinina is a complex polycyclic molecule. It features a central benzene ring with a methyl group (-CH₃) at the 1-position and another methyl group (-CH₃) at the 4-position. This benzene ring is fused to a six-membered ring on the left and a six-membered ring on the right. The six-membered ring on the right has a methyl group (-CH₃) at the 2-position and a hydrogen atom at the 3-position.</p>
<p>Fumonisin B₁</p>  <p>The structure of Fumonisin B₁ is a highly complex polycyclic molecule. It features a central benzene ring with a methyl group (-CH₃) at the 1-position and another methyl group (-CH₃) at the 4-position. This benzene ring is fused to a six-membered ring on the left and a six-membered ring on the right. The six-membered ring on the left has a methyl group (-CH₃) at the 2-position and a carboxylic acid group (-COOH) at the 3-position. The six-membered ring on the right has a hydroxyl group (-OH) at the 2-position and a methyl group (-CH₃) at the 3-position. The molecule also contains several other functional groups, including a carboxylic acid group (-COOH) and a hydroxyl group (-OH) on the side chain.</p>	

1.4.2.2. Producción de compuestos volátiles

La producción de algunos compuestos volátiles por parte de los microorganismos aislados frecuentemente en el corcho han sido descritos como los causantes del “gusto a corcho” de los vinos en contacto con ellos (Moreau 1977, Riboulet 1982)

Sin embargo, diversos autores han demostrado que el “gusto a corcho” no sólo tiene un origen microbiano en los tapones de corcho, sino que puede ser producido en las barricas de madera, en uvas en mal estado y en materiales de embalaje. Así mismo, estos compuestos volátiles pueden tener un origen no microbiano a partir de las plataformas de madera, tratadas con insecticidas a base de policlorofenoles, utilizadas para almacenar las botellas y también del cloro utilizado para desinfectar los tapones de corcho (Bertrand y Barrios 1994, Cantagrel y Vidal 1989, Chatonnet *et al* 1992, Laszlavik *et al* 1995, Mazzoleni *et al* 1996, Tindale *et al* 1989, Tribaut y Valade 1996, Whitfield *et al* 1991a).

Son numerosos y variados los compuestos volátiles de origen microbiano que pueden conferir olores desagradables al vino, entre los cuales se deben destacar el guayacol, el 2,4,6-tricloroanisol (TCA) y el 2,3,4,6-tetracloroanisol como los principales causantes del “gusto a corcho” en los vinos (Buser *et al* 1982, Fumi *et al* 1996, Mazzoleni *et al* 1994, Navascués 1998).

En la tabla 5, se especifican algunos de los compuestos volátiles causantes del “gusto a corcho”.

Tabla 5. Compuestos volátiles productores del “gusto a corcho” en vinos

Compuestos no clorados	Compuestos clorados
1-octen-3-ol	2,4,6-tricloroanisol (TCA)
1-octen-3-ona	2,3,4,6-tetracloroanisol (TeCA)
2-metil-isoborneol	Pentacloroanisol (PCA)
Geosmina	
Guayacol	

Algunas especies de *Aspergillus*, como *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus* y de *Penicillium* como *P. citrinum* y *P. roquefortii* producen octano, octanona-3-ol y octanol; igualmente entre las bacterias algunos *Actinomycetales* producen geosmina y metilsoborneol.

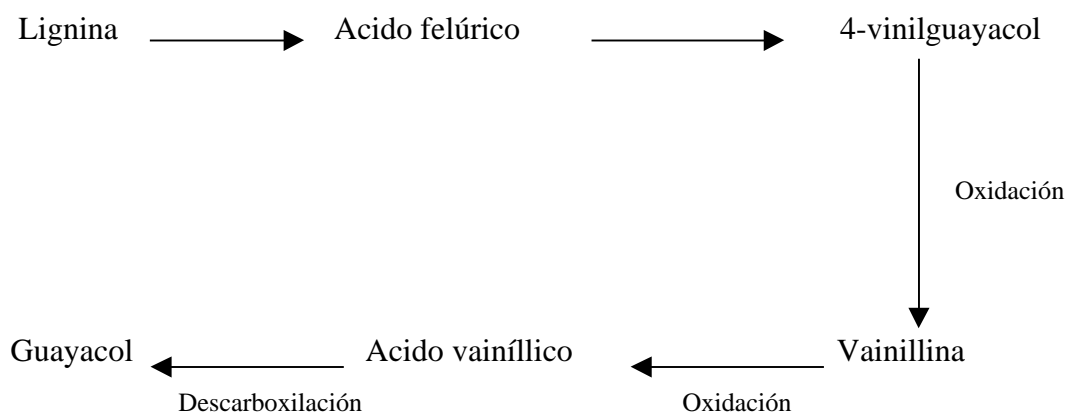
En los próximos apartados se especificarán la producción de guayacol y de 2,4,6-tricloroanisol por los microorganismos pertenecientes a la microbiota del corcho.

1.4.2.2.1. Producción de guayacol

El guayacol es un compuesto fenólico que se forma de la degradación química o térmica de la lignina y cuyos compuestos intermediarios son la vainillina y el ácido vainílico (Boidron *et al* 1984, Lefebvre *et al* 1983).

Desarrolla aromas fenólicos, a humo o medicina que pueden ser detectados en alimentos y bebidas, incluido el vino, a concentraciones de 20 µg/l (Simpson 1990).

En el esquema 1 se ilustra la formación del guayacol a partir de la lignina .



Esquema 1. Formación del guayacol a partir de la lignina

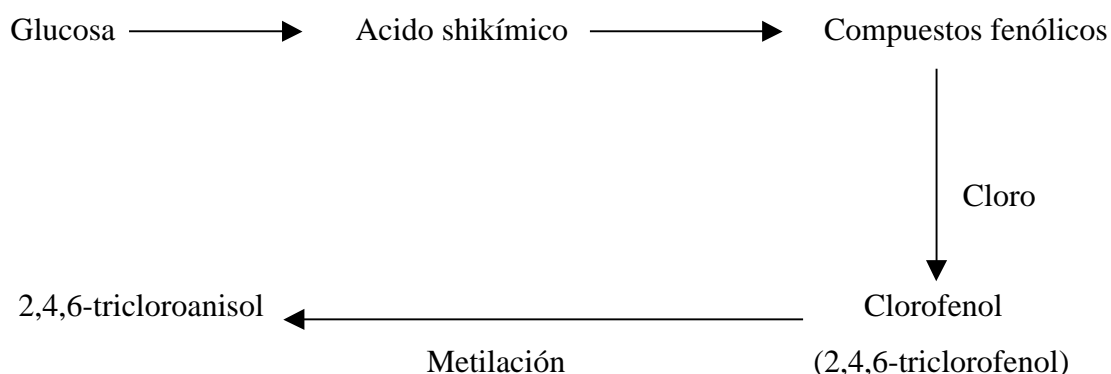
El guayacol puede estar presente como contaminante de los tapones de corcho durante las diferentes fases de su fabricación, pero también puede ser producido en los mismos por *Streptomyces sp* (Codina *et al* 1993, Lefebvre *et al* 1983, Pettey y Crawford 1984, Simpson 1990).

1.4.2.2.2. Producción de 2,4,6-tricloroanisol (TCA)

Los cloroanisoles y en especial el 2,4,6-tricloroanisol han sido descritos como productores de cambios organolépticos en alimentos y bebidas y como responsables del “gusto a corcho” en los vinos (Curtis *et al* 1972, Evans *et al* 1997, Rigaud *et al* 1984, Simpson 1990, Whitfield *et al* 1986 y Whitfield *et al* 1987).

El 2,4,6-tricloroanisol produce aromas indeseables conocidos como olor a moho, húmedo, libro viejo, sótano húmedo. Puede ser originado a partir del metabolismo microbiano, de los tratamientos de lavado de los tapones a base de hipoclorito de sodio (por lo que su uso ha sido abandonado por los fabricantes de este producto) y de los compuestos fenólicos que forman parte de la pared celular del tejido suberoso (Navascués 1998, Simpson 1990).

En el esquema 2, se ilustra una de las posibles vías de formación del 2,4,6-tricloroanisol por *Penicillium sp* (Simpson 1990).



Esquema 2. Formación del 2,4,6-tricloroanisol por *Penicillium sp*

Diversos hongos filamentosos, pertenecientes a la micoflora del corcho han sido reseñados como productores de TCA, así vemos *Penicillium sp*, *Mucor sp*, *Neurospora sp*, *Paecilomyces variotii* y *Phanerochaete chrysosporum* son productores de TCA a partir del precursor TCF, pero también de otros compuestos fenólicos y del hipoclorito de sodio. (Codina *et al* 1993, Joshi y Gold 1993, Maujean *et al* 1985, Valli y Gold 1991, Whitfield *et al* 1991b).

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

El estudio exhaustivo de la calidad microbiológica de los alimentos y de todos los materiales en contacto con éstos es de vital importancia para garantizar productos de consumo con una óptima calidad sanitaria y comercial. El objetivo general de este estudio es evaluar la calidad microbiológica de tapones de corcho natural para vinos tranquilos y vinos espumosos, producidos en fábricas elaboradoras de este producto en Catalunya.

Las hipótesis de trabajo planteadas, se han dividido en dos partes con la finalidad de abarcar los temas a tratar en la presente investigación:

Parte I

H₀: Las metodologías establecidas para el análisis microbiológico de los tapones de corcho para vinos permiten establecer correctamente la microbiota de este producto.

H₁: Las metodologías establecidas para el análisis microbiológico de los tapones de corcho para vinos no permite establecer correctamente la microbiota de este producto.

Parte II

H₀: Las características metabólicas de los microorganismos presentes en los tapones de corcho para vinos pueden afectar la calidad de los mismos.

H₁: Las características metabólicas de los microorganismos presentes en los tapones de corcho para vinos no pueden afectar la calidad de los mismos.

Los objetivos específicos de la presente investigación, son los siguientes:

1. Evaluar las metodologías normalizadas para el análisis microbiológico de tapones de corcho para vinos para vinos espumosos y vinos tranquilos
2. Aislar e identificar los hongos filamentosos, levaduras y bacterias presentes en muestras de tapones de corcho para vinos espumosos y vinos tranquilos.
3. Determinar la actividad enzimática de los microorganismos aislados.
4. Determinar la actividad inhibitoria de los microorganismos aislados.
5. Determinar la capacidad de producción de micotoxinas por parte de los microorganismos aislados descritos como productores de estos compuestos.

Para cumplir con los objetivos planteados, se desarrolló el siguiente plan de trabajo:

1. Preparación de los tapones control.
2. Evaluación de los métodos establecidos para el análisis microbiológico de tapones de corcho para vinos espumosos y vinos tranquilos.
3. Obtención de muestras.
4. Procesamiento de muestras.
5. Recuento, aislamiento e identificación de hongos filamentosos, levaduras y bacterias presentes en las muestras.
6. Estudio de la capacidad enzimática de los microorganismos aislados.
7. Estudio de la capacidad inhibitoria de los microorganismos aislados.
8. Estudio de la producción de micotoxinas por hongos filamentosos aislados.