

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

**HONGOS Y MICOTOXINAS EN TAPONES DE CORCHO.  
PROPUESTA DE LÍMITES MICOLÓGICOS  
ACEPTABLES**

**TESIS DOCTORAL**

**MARGARIDA PI i CONTALLÉ  
2006**



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

**HONGOS Y MICOTOXINAS EN TAPONES DE  
CORCHO. PROPUESTA DE LÍMITES  
MICOLÓGICOS ACEPTABLES**

Memoria redactada para optar al grado de Doctor en Biología por la  
Universidad Autónoma de Barcelona

**Margarida Pi i Contallé**

Visto bueno de la Directora de la Tesis

Dra. M<sup>a</sup> Angeles Calvo Torras.

Bellaterra, 2006

## **AGRAIMENTS:**

**A la meva directora de tesi: Dra. M<sup>a</sup> Àngels Calvo, perquè sense el seu saber, paciència i ànims mai hauria pogut realitzar aquesta tesi.**

**Vull fer una menció també a en Carles Adelantado de Veterinària per la seva ajuda a la part final de la tesi.**

**A en Joan Puig, en Miquel Mascort, la Marta Montalbán i la Marta Moliner del Institut Català del suro que em van ajudar molt al principi i durant la part pràctica de la tesi. I també a les empreses sureres catalanes que em van proporcionar taps per poder realitzar els assajos.**

**A la Sra. Anna Serra i al Sr. Robert Serra de MANUEL SERRA, SA per permetrem compaginar la meva feina a la empresa amb la elaboració de la tesi.**

**A les meves amigues Rosa, Assumpció i Merçe per escoltar-me**

**A la meva família per la seva paciència i ajuda. Gràcies.**

## ÍNDICE

---

## ÍNDICE

### RESUMEN

<b>1. <u>INTRODUCCIÓN</u></b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. CARACTERÍSTICAS DEL CORCHO</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2. ELABORACIÓN DE TAPONES DE CORCHO</b> .....	<b>2</b>
<b>1.2.1. Tapones de corcho natural para vinos tranquilos</b> .....	<b>6</b>
<b>1.2.2. Arandelas o discos de corcho natural</b> .....	<b>9</b>
<b>1.2.3. Fabricación de tapones aglomerados y/o mangos para tapones de vino espumoso</b> .....	<b>11</b>
<b>1.2.4. Tapones para vino espumoso</b> .....	<b>13</b>
<b>1.3 MICROBIOLOGÍA DEL CORCHO</b> .....	<b>15</b>
<b>1.3.1. Microorganismos aislados del corcho</b> .....	<b>15</b>
<b>1.3.2. Micotoxinas</b> .....	<b>17</b>
<b>1.3.3. Relación micotoxinas – hongos micelares</b> .....	<b>19</b>
<b>1.4 FACTORES CONDICIONANTES PARA EL DESARROLLO DE HONGOS Y PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS</b> .....	<b>21</b>
<b>1.4.1. Factores físicos</b> .....	<b>21</b>
1.4.1.1. Actividad del agua .....	<b>21</b>
1.4.1.2. Temperatura.....	<b>22</b>
1.4.1.3. Condiciones climatológicas.....	<b>22</b>
<b>1.4.2 Factores químicos</b> .....	<b>22</b>
1.4.2.1. pH.....	<b>22</b>
1.4.2.2. Composición del substrato.....	<b>22</b>
1.4.2.3. Potencial de oxidación.....	<b>23</b>
<b>1.4.3. Factores biológicos</b> .....	<b>23</b>
1.4.3.1. Géneros específicos o productores de micotoxinas.....	<b>23</b>
1.4.3.2. Presencia de otros microorganismos.....	<b>23</b>
<b>1.5 TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE MICOTOXINAS</b> .....	<b>23</b>
<b>1.6 EL PROBLEMA DE LOS SABORES A CORCHO EN LOS VINOS EMBOTELLADOS</b> .....	<b>24</b>
<b>1.7 ASPECTOS LEGALES</b> .....	<b>25</b>

<b>1.8 NORMAS DEL SECTOR CORCHERO EN VIGOR QUE CONTEMPLAN LA MICROBIOLOGÍA DE LOS DIFERENTES TIPOS DE TAPONES.....</b>	<b>27</b>
<b>2. <u>OBJETIVOS Y PLAN DE Y TRABAJO</u> .....</b>	<b>30</b>
<b>2.1 OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
<b>2.2 PLAN DE TRABAJO.....</b>	<b>31</b>
<b>3. <u>MATERIAL Y MÉTODOS</u></b>	
<b>3.1.TAPONES DE CORCHO.....</b>	<b>32</b>
<b>3.2. MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
<b>3.2.1. Método para el recuento de hongos presentes en tapones de corcho. Ref: Met 01.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2.2. Método para el aislamiento de hongos. Ref: Met 02.....</b>	<b>35</b>
<b>3.2.3. Método para la identificación de hongos filamentosos hasta nivel de género. Ref: Met 03.....</b>	<b>36</b>
<b>3.2.4. Método para el desarrollo de hongos para su identificación hasta nivel DEspecie. Ref: Met04.....</b>	<b>37</b>
<b>3.2.5 Método para detectar la actividad inhibitoria de hongos habitualmente presentes en tapones de corcho. Ref: Met 05.....</b>	<b>38</b>
<b>3.2.6 Método para la determinación de la actividad enzimática de hongos habitualmente presentes en tapones de corcho. Ref: Met 06.....</b>	<b>39</b>
<b>3.2.7 Método determinación del ph de los tapones de corcho. Ref: Met 07.....</b>	<b>41</b>
<b>3.2.8. Método de esterilización de los tapones de corcho. Ref: Met 08....</b>	<b>42</b>
<b>3.2.9. Método para el cálculo de diámetro de los tapones de corcho Ref: Met 09.....</b>	<b>43</b>
<b>3.2.10. Método para el cálculo de la longitud de los tapones de corcho Ref: Met 10.....</b>	<b>44</b>
<b>3.2.11. Método para el cálculo de la humedad en los tapones de corcho esterilizados. Ref: Met 11.....</b>	<b>45</b>
<b>3.2.12. Método para el cálculo de la densidad de los tapones de corcho Ref: Met 12.....</b>	<b>46</b>
<b>3.2.13. Método para el cálculo de la fuerza de extracción de los tapones de corcho. Ref: Met 13.....</b>	<b>47</b>
<b>3.2.14. Método para el cálculo de la tensión de rotura por torsión de los tapones de corcho. Ref: Met 14.....</b>	<b>48</b>

3.2.15. Método para determinar la concentración de las suspensiones de hongos filamentosos. Ref: Met 15.....	49
3.2.16. Método para la inoculación por inmersión de diferentes hongos en tapones de corcho. Ref: Met 16.....	50
3.2.17. Método para la cuantificación de hongos de los diferentes tipos de tapones de corcho inoculados. Ref: Met 17 .....	51
3.2.18. Método para la realización de cromatografías en capa fina. Ref: Met 18 .....	52
3.2.19. Método para determinar la presencia de metabolitos secundarios en los hongos aislados en los tapones de vino tranquilo y vino espumoso inoculados durante 7,14 y 21 días a través de cromatofolios. Ref: Met 19.....	53
3.2.20. Método de extracción de micotoxinas. Ref: Met 20 .....	54
3.2.21. Método para determinar la producción de micotoxinas de los hongos inoculados en los tapones de vino tranquilo y de vino espumoso durante 7, 14 y 21 días. Ref: Met 21.....	55
3.2.22. Método para determinar la presencia de Ocratoxina a mediante sistema ELISA. Ref: Met22.....	56
3.2.23. Método para determinar la presencia de toxina t-2 mediante sistema ELISA. Ref: Met 23.....	58
3.2.24. Método para determinar la presencia de Aflatoxinas mediante sistema ELISA. Ref: Met 24.....	60
3.2.25. Método para determinar la presencia de Fumonisina mediante sistema ELISA Ref: Met 25.....	62
3.2.26. Método para determinar la presencia de Zearalenona mediante sistema ELISA Ref: Met 26.....	64
3.2.27. Método para determinar la presencia de toxina DON mediante sistema ELISA Ref: Met 27. ....	66
3.2.28. Método para la inoculación de micotoxinas en tapones de corcho y evaluación de la migración de las mismas. Ref: Met 28.....	68
<b>4.- <u>RESULTADOS</u>.....</b>	<b>70</b>
<b>4.1 RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS Y LEVADURAS A PARTIR DE TAPONES DE CORCHO.....</b>	<b>70</b>
<b>4.2. RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LAS CEPAS AISLADAS DE TAPONES DE CORCHO. ....</b>	<b>72</b>
<b>4.3. RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS HONGOS FILAMENTOSOS INVESTIGADOS.....</b>	<b>74</b>
<b>4.4. RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA REALIZACIÓN DE LAS CROMATOGRAFÍAS EN CAPA FINA.....</b>	<b>76</b>



<b>4.5. DETERMINACIONES DE pH DE LOS DIVERSOS TAPONES INVESTIGADOS.....</b>	<b>79</b>
<b>4.6. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL PROCESO DE ESTERILIZACIÓN DE TAPONES.....</b>	<b>80</b>
<b>4.7. RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA INOCULACIÓN EXPERIMENTAL DE CEPAS FÚNGICAS EN LOS TAPONES DE CORCHO.....</b>	<b>81</b>
<b>4.8 RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA RECUPERACIÓN DE LAS MEZCLA DE CEPAS FÚNGICAS EXPERIMENTALMENTE INOCULADAS.....</b>	<b>85</b>
<b>4.9 RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE LA DETECCIÓN DE MICOTOXINAS EN LOS TAPONES INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE CON CEPAS PRODUCTORAS.....</b>	<b>87</b>
<b>4.9.1 Resultados obtenidos en el estudio de la detección de Aflatoxinas en los tapones inoculados experimentalmente con <i>Aspergillus flavus</i>.....</b>	<b>88</b>
<b>4.9.2. Resultados obtenidos en el estudio de la detección de Aflatoxinas en los tapones inoculados experimentalmente con <i>Penicillium citrinum</i>.....</b>	<b>90</b>
<b>4.9.3. Resultados obtenidos en el estudio de Aflatoxinas en los tapones inoculados experimentalmente con <i>Penicillium frequentans</i>.....</b>	<b>92</b>
<b>4.9.4. Resultados obtenidos en el estudio de Ocratoxina A en los tapones inoculados experimentalmente con <i>Penicillium purpurescens</i>.....</b>	<b>94</b>
<b>4.9.5. Resultados obtenidos en el estudio de la detección de DON en los tapones inoculados experimentalmente con <i>Fusarium moniliforme</i>.....</b>	<b>96</b>
<b>4.9.6. Resultados obtenidos en el estudio de la detección de Fumonisinias en los tapones inoculados experimentalmente con <i>Fusarium moniliforme</i>.....</b>	<b>98</b>
<b>4.9.7. Resultados obtenidos en el estudio de la detección de Zearalenona en los tapones inoculados experimentalmente con <i>Fusarium moniliforme</i>.....</b>	<b>100</b>
<b>4.9.8. Resultados obtenidos en el estudio de la detección de Ocratoxina A en los tapones inoculados experimentalmente con <i>Aspergillus ochraceus</i>.....</b>	<b>102</b>
<b>4.9.9. Resultados obtenidos en el estudio de la detección de Ocratoxina A en los tapones inoculados experimentalmente con <i>Aspergillus niger</i>.....</b>	<b>104</b>
<b>4.10 RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LAS POSIBLES MIGRACIONES DE LAS MICOTOXINAS INOCULADAS.....</b>	<b>106</b>

<b>4.11. RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA DETECCIÓN DE MICOTOXINAS EN TAPONES DE MERCADO. ....</b>	<b>112</b>
--	------------

## **5. DISCUSIÓN**

<b>5.1. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS Y LEVADURAS A PARTIR DE TAPONES DE CORCHO.....</b>	<b>117</b>
<b>5.2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LAS CEPAS HABITUALMENTE AISLADAS DE TAPONES DE CORCHO.....</b>	<b>120</b>
<b>5.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS CEPAS HABITUALMENTE AISLADAS DE LOS TAPONES DE CORCHO.....</b>	<b>120</b>
<b>5.4. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA REALIZACIÓN DE LAS CROMATOGRAFÍAS EN CAPA FINA.....</b>	<b>122</b>
<b>5.5. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL PROCESO DE ESTERILIZACIÓN DE TAPONES.....</b>	<b>123</b>
<b>5.6. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS DETERMINACIONES DEL pH DE LOS DIVERSOS TAPONES INVESTIGADOS.....</b>	<b>124</b>
<b>5.7. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA RECUPERACIÓN DE CEPAS FÚNGICAS EXPERIMENTALMENTE INOCULADAS.....</b>	<b>124</b>
<b>5.8 DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE LA DETECCIÓN DE MICOTOXINAS EN LOS TAPONES INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE CON CEPAS PRODUCTORAS.....</b>	<b>125</b>
<b>5.8.1. Discusión de los resultados obtenidos en el estudio de la detección de Aflatoxinas en los tapones inoculados experimentalmente con <i>Aspergillus flavus</i>.....</b>	<b>125</b>
<b>5.8.2. Discusión de los resultados obtenidos en el estudio de la detección de Aflatoxinas en los tapones inoculados experimentalmente con <i>Penicillium citrinum</i> .....</b>	<b>126</b>
<b>5.8.3 Discusión de los resultados obtenidos en el estudio de la detección de Aflatoxinas en los tapones inoculados experimentalmente con <i>Penicillium frequentans</i>.....</b>	<b>126</b>
<b>5.8.4. Discusión de los resultados obtenidos en el estudio de la detección de Ocratoxina A en los tapones inoculados experimentalmente con <i>Penicillium purpurescens</i> .....</b>	<b>126</b>

5.8.5. Discusión de los resultados obtenidos en el estudio de la detección de DON en los tapones inoculados experimentalmente con <i>Fusarium moniliforme</i> .....	127
5.8.6. Discusión de los resultados obtenidos en el estudio de la detección de Fumonisinias en los tapones inoculados experimentalmente con <i>Fusarium moniliforme</i> .....	127
5.8.7. Discusión de los resultados obtenidos en el estudio de la detección de Zearalenona en los tapones inoculados experimentalmente con <i>Fusarium moniliforme</i> .....	128
5.8.8 Discusión de los resultados obtenidos en el estudio de la detección de Ocratoxina A en los tapones inoculados experimentalmente con <i>Aspergillus ochraceus</i> ....	128
5.8.9 Discusión de los resultados obtenidos en el estudio de la detección de Ocratoxina A en los tapones inoculados experimentalmente con <i>Aspergillus niger</i> .....	129
<b>5.9. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LAS POSIBLES MIGRACIONES DE LAS MICOTOXINAS INOCULADAS.....</b>	<b>129</b>
5.9.1. Discusión de los resultados obtenidos en las migraciones de Aflatoxinas.....	129
5.9.2. Discusión de los resultados obtenidos en las migraciones de DON.....	130
5.9.3. Discusión de los resultados obtenidos en las migraciones de Fumonisinias.....	130
5.9.4. Discusión de los resultados obtenidos en las migraciones de Ocratoxina A .....	130
5.9.5. Discusión de los resultados obtenidos en las migraciones de toxina T-2.....	131
<b>5.10. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA DETECCIÓN DE MICOTOXINAS EN TAPONES DE MERCADO.....</b>	<b>132</b>
<b>5.11. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LOS VALORES MÁXIMOS OBTENIDOS EN LOS ENSAYOS DE MICOTOXINAS.....</b>	<b>133</b>
<b>6. <u>CONCLUSIONES</u>.....</b>	<b>134</b>
<b>7. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>.....</b>	<b>135</b>

---

RESUMEN

## **RESUMEN**

Los tapones de corcho se utilizan desde hace muchos años para cerrar botellas que contienen diferentes tipos de vinos. Por este motivo, los tapones de corcho deben ser considerados productos en contacto con bebidas de consumo humano y en consecuencia deberían estar legislados los límites microbiológicos aceptables para cumplir con la Seguridad Alimentaria.

Las normativas existentes, para tapones de corcho, hasta hoy, en el ámbito microbiológico solo exigen recuentos totales de hongos filamentosos y levaduras y de bacterias aerobias mesófilas.

El principal objetivo de este trabajo es determinar si los hongos presentes en los tapones de corcho son capaces de elaborar y acumular micotoxinas que difundan a los vinos y en consecuencia proponer si es preciso, los límites tanto de recuentos fúngicos como de especies fúngicas y de sus micotoxinas en estos productos

Para desarrollar este objetivo se ha realizado una identificación de las cepas de hongos existentes en los tapones de corcho y se han separado las que a nivel bibliográfico se citan como capaces de elaborar las micotoxinas legisladas.

A partir de cultivos específicos se han realizado recuentos y extracciones a los 7, 14 y 21 días con el fin de llevar a cabo cromatografías en capa fina y poder verificar si las cepas seleccionadas son productoras de micotoxinas.

Asimismo se ha estudiado la actividad inhibitoria de las cepas fúngicas, mayoritariamente aisladas. Se observó que estas especies son capaces de inhibir el desarrollo de *Monilia sitophila*, hongo propio del sustrato en estudio.

Paralelamente se ha evaluado la actividad enzimática de estas cepas, pudiéndose observar que las que presentan mayor actividad son: *Monilia sitophila*, *Aspergillus niger*, *Penicillium frequentans*, *Penicillium purpurescens* y *Aspergillus ochraceus*.

Posteriormente se ha esterilizado diferentes tipos de tapones de corcho y se ha comprobado si se han modificado sus características. Tras la esterilización, se procedió a inocular las ocho cepas de hongos productoras de micotoxinas, objeto de este estudio.

Se ha calculado el porcentaje de recuperación de los hongos inoculados y se han realizado extracciones para verificar, por medio de la cromatografía en capa fina, la producción de micotoxinas.

A continuación, se ha procedido a adaptar una técnica ELISA para determinar y cuantificar las micotoxinas legisladas (aflatoxinas, ocratoxinas, fumonisinas, DON, zearalenona y toxina T-2) en estos tapones de corcho inoculados con las cepas de hongos productores.

Para reflejar la realidad del sector corchero se han seleccionado tapones de mercado que han sido sometidos a un proceso de extracción y posterior evaluación por la técnica ELISA para cuantificar las posibles micotoxinas existentes.

Finalmente se han realizado inoculaciones de micotoxinas en diferentes tipos de tapones de corcho y se han introducido en botellas de vino, para poder determinar el grado de migración de estas micotoxinas al vino.

A partir de los resultados obtenidos se proponen valores límite de presencia en los diferentes tipos de tapones de corcho de las cepas de hongos productores de micotoxinas y de las micotoxinas legisladas.

# INTRODUCCIÓN

---

## **1.- INTRODUCCIÓN**

### **1.1. CARACTERÍSTICAS DEL CORCHO**

El corcho se extrae del alcornoque (*Quercus suber*). La distribución de los bosques de alcornocales se da en clima mediterráneo y principalmente sobre suelos silicios. Los principales países productores son: Portugal, España, Marruecos, Algeria, Túnez, Francia e Italia.

El corcho es la capa externa de la corteza del árbol (*Quercus suber*) y se forma a través de una capa generadora (denominada felógeno o *cambium* suberógeno) que es parte de los tejidos meristemáticos que permiten el crecimiento en grosor de la planta. La actividad del felógeno no es continua sino que sigue variaciones estacionales en función de los cambios de humedad y de temperatura.

Las células formadas en la primavera y a principios de verano, período de crecimiento rápido, son más largas y de paredes más delgadas mientras que las células de otoño son más cortas y de paredes más gruesas. La alternancia de estas pequeñas diferencias estacionales delimita las líneas o venas que corresponden al crecimiento anual del súber. El grosor de las venas varía según la edad, el estado fisiológico de la planta y las condiciones climáticas. En general está comprendido entre 2 y 6 mm.

Existen numerosos poros cuya función es comunicar los tejidos vivos del árbol con el exterior para facilitar la respiración. Se deben a la presencia en el felógeno de lenticelas unas pequeñas áreas de de 0,2 a 8 mm de diámetro, en las que las células generatrices, en lugar de suber originan las células complementarias, poco impregnadas de suberina y con abundantes espacios intercelulares para facilitar el intercambio de gases.

Las lenticelas son activas durante varios años y su rastro es visible en forma de canales lenticelares o poros que atraviesan radialmente el tejido. Cada centímetro cúbico de corcho contiene de treinta a cuarenta millones de pequeñas células suberosas íntimamente unidas por sus paredes sin dejar espacios intercelulares. Cuando las células han completado su maduración el contenido del citoplasma desaparece quedando únicamente las paredes impregnadas de suberina.

El tejido suber queda formado por pequeñas celdas impermeables de 30 a 40  $\mu\text{m}$  de diámetro llenas de aire solamente interrumpidas por la presencia de canales lenticelares, éstos son pequeños poros de forma elipsoidal casi cilíndrica ocupados por las llamadas células complementarias laxamente dispuestas y muy ricas en taninos que les dan una tonalidad oscura o terrosa. (81)



El corcho, no se obtiene hasta que el árbol alcanza los 30 años y el primer corcho extraído, denominado bornizo, no es apto para la fabricación de tapones. A partir de esta primera extracción, pasan como mínimo 9 años para poder realizar la segunda, y este corcho, se llama segundero, ya es apto para poder fabricar tapones, aunque el verdadero corcho de producción es el obtenido a partir de la tercera extracción, debe tenerse en cuenta que el alcornoque puede llegar a vivir unos 200 años. (23, 24, 73, 81, 97, 98)

Cuando se ha realizado la extracción del corcho, empieza el proceso para la elaboración de los tapones de corcho.



Extracción de corcho  
(Fuente: M. Pi)



Apilado de planchas  
(Fuente: M. Pi)

## 1.2. ELABORACIÓN DE TAPONES DE CORCHO

El primer proceso es la obtención de las planchas que se agrupan en pilas y por desecación al aire pierden parte de su contenido en agua, pasadas unas ocho semanas se procede a pesarlo. El corcho puede llegar a perder hasta un 30% de su peso. Estas planchas se disponen en pilas rectangulares con la parte ancha de las planchas perpendicular al viento dominante, esta disposición, favorece el secado de las planchas que deben permanecer apiladas a la intemperie como mínimo unos 6 meses, con lo que se consigue así su secado y su estabilización.



Planchas de corcho antes de hervir (Fuente: M. Pi)

Pasado este tiempo el corcho es sometido a la operación del hervido con agua. Con este proceso quedan disueltos en agua algunos constituyentes del corcho, en especial, parte de las materias tánicas y ciertas sustancias minerales y también se eliminan microorganismos. Esta operación hace que el corcho se vuelva flexible y blanco y que aumente su grosor.

El corcho se hierve en calderos, que son recipientes de acero inoxidable, donde se disponen las planchas de corcho, cuando el agua hierve, durante unos 90 minutos. El corcho hervido pierde entre un 12 y un 15% del su peso y gana alrededor de un 20% de grosor.



Hervido de las planchas de corcho (Fuente: M. Pi)

Después de hervir el corcho, debe pasar un período de estabilización (de 2 a 4 semanas), donde se aplana la plancha y se seca hasta obtener la consistencia adecuada para cortarlo. (97, 98)

El reposo se efectúa en bodegas, que deben estar limpias, ventiladas y libres de olores que pueda absorber el corcho.

Seguidamente se procede al recortado del corcho, que consiste en eliminar los bordes irregulares de las planchas con una cuchilla, para dejar un corte liso que servirá para realizar el calibrado y selección del corcho.

Posteriormente este corcho se clasifica según calibres o espesor, separando:

- a) el corcho de rechazo. Presenta hendiduras extensas y profundas y es un corcho con excesiva porosidad.
- b) el corcho blando con un crecimiento anual excesivo.
- c) el corcho atacado por infecciones microbianas, por insectos, etc.

Del conjunto de corcho en bruto que se recolecta anualmente, el corcho de rechazo supera el 40%. La mayoría de este corcho de rechazo, se aprovecha para realizar granulados, que permitirán elaborar los tapones aglomerados. Después de separar el corcho de rechazo obtenemos el corcho en raza limpio o corcho enrazado. (97, 98)

El corcho enrazado se clasifica según calibres (grosor) y calidad. Los calibres se miden en líneas que equivalen a 2,25 mm. Así tenemos:

- a) corcho de menos de 11 líneas
- b) corcho de 11 a 13 líneas
- c) corcho de 13 a 15 líneas
- d) corcho de 15 a 19 líneas
- e) corcho de más de 19 líneas.

El corcho clasificado por líneas, se reclasifica posteriormente según calidad (clase visual). Podemos establecer las siguientes categorías:

- a) corcho Primera
- b) corcho Segunda
- c) corcho Tercera

- d) corcho Cuarta
- e) corcho Quinta
- f) corcho Sexta
- g) corcho Séptima
- h) corcho de Rechazo

Aunque la mayoría de las veces se agrupan las clases.

Después de la clasificación, las industrias preparadoras, prensan y enfardan las planchas, para facilitar el transporte a las industrias corcheras. Estos fardos son almacenados en lugares ventilados, evitando el contacto de las planchas con el suelo. No está permitido el uso de soportes (palets) de madera tratada para almacenar los fardos. (97, 98)

Los fardos prosiguen su proceso en la industria corchera.

En primer lugar, se vuelven a hervir durante unos 60 minutos a 100°C y se disponen en una bodega, como máximo durante una semana para evitar que haya una proliferación elevada de hongos en las planchas.



Fardos de corcho hervidos dispuestos en la bodega (Fuente: M. Pi)

A partir de aquí empiezan diferentes procesos según se desee fabricar:

- **Tapones de corcho natural para vinos tranquilos.**
- **Arandelas de corcho natural**
- **Tapones o mangos aglomerados.**
- **Tapones para vino espumoso**

### **1.2.1. Tapones de corcho natural para vinos tranquilos**

Para la fabricación de tapones de corcho natural para vino tranquilo se procede de la siguiente manera:

Se sacan los fardos de la bodega y se desenfardan, seleccionando plancha a plancha y rebanando al grosor adecuado para poder fabricar tapones de las siguientes longitudes: 54 mm, 49 mm, 44 mm, y 39 mm.

Posteriormente, se disponen en silos hasta que se trasladan a las máquinas de perforar, las tiras de corcho o rebanadas se introducen una a una y por medio de la acción de las gubias, mediante el corte, se obtiene tapones semielaborados. En los tapones podemos diferenciar la gama de clases que se establecen, generalmente de forma visual, por tanto se procede a realizar la primera selección en la que se eliminan los trozos de corcho que no servirán para tapar botellas. A los restantes tapones se les clasifica entre 3 y 5 clases. Estos tapones presentan una humedad elevada y se llevan a un secador para obtener la humedad regulada por normativa 5-8%.

Cuando los tapones alcanzan la humedad deseada, se procede a calibrarlos.

A continuación se esmerilan para conseguir la longitud adecuada, por ejemplo: un tapón de 49 mm por Norma tiene una tolerancia de  $\pm 0,5$  mm. Posteriormente se pulen, es decir que se rectifica su diámetro que normalmente suele ser de 24 mm. y por Norma la tolerancia es de  $\pm 0,4$  mm.

Cuando los tapones tienen las medidas adecuadas, se procede a su lavado que generalmente suele ser con peróxidos de hidrogeno, pasado el tiempo de estabilización establecido, los tapones son igualados, mediante la aplicación de un anticapilar, que precisa de un tiempo de estabilización o reposo para que se evaporen los disolventes.

Seguidamente se seleccionan los tapones a través de máquinas de visión artificial o también a través de selección manual.

A partir de este punto, podemos indicar que se han seleccionado las diferentes clases para los diferentes clientes.

Posteriormente, los tapones se personalizan con las diferentes marcas de las diferentes bodegas, estos marcajes se pueden realizar a tinta o a fuego.

Por último y en los tapones para botellas de vino tranquilo, se aplica una capa de silicona o parafina para que la operación de introducirlos y posterior descorchado cumpla la Normativa del sector.

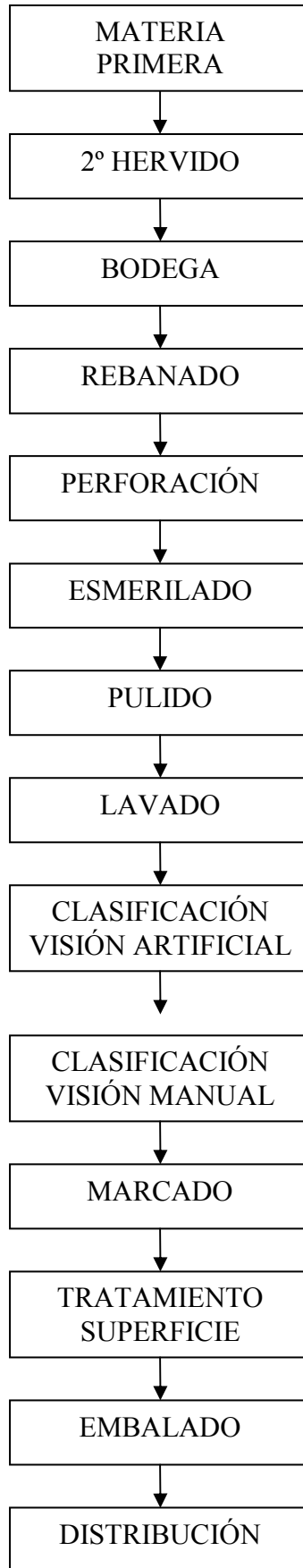
Los tapones ya están a punto para su expedición, por lo que se procede a su recuento, se envasan en bolsas de polietileno, a las que se adiciona SO<sub>2</sub>, se sueldan las bolsas y se depositan en cajas de cartón para poder ser enviadas a los diferentes clientes.



Tapón de corcho para vino tranquilo

Tapón de corcho para vino espumoso

El proceso de elaboración de tapones para vinos tranquilos se resume en el Esquema núm. 1. (21, 94, 97, 98, 100)



ESQUEMA núm. 1

### **1.2.2. Arandelas o discos de corcho natural**

Para la fabricación de arandelas de corcho natural se procede de la siguiente manera:

Se obtienen de planchas de corcho natural que presentan un calibre inferior a 11 líneas corcheras (recordamos que una línea corchera son 2,25 mm.) y además tienen una clase visual comprendida entre la Primera y la Quinta.

Seleccionadas las planchas se rebana el corcho, eliminándose el vientre y la espalda y se cortan unas láminas de unos 6 mm. de grosor (de cada rebanada se obtienen de 3 a 4 láminas de 6 mm).

Estas láminas se introducen en la máquina perforadora, donde a través de gúbias se perforan las láminas obteniendo las arandelas o discos de corcho natural. El resto de corcho y de láminas defectuosas se disponen para triturar.

Las arandelas se clasifican y se eliminan las que no están bien fabricadas o les falta un trozo.

Después, las arandelas se esmerilan para obtener unas caras planas y paralelas a los discos, con el fin de facilitar los procesos posteriores.

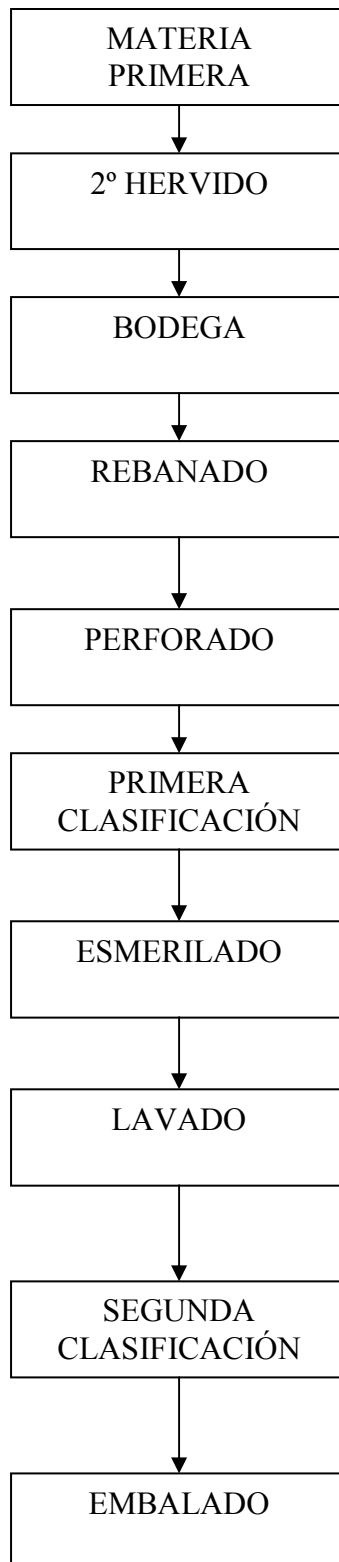
Hay industrias que lavan las arandelas, siguiendo los mismos métodos que los utilizados para lavar los tapones naturales para vinos tranquilos.

Posteriormente se realiza la clasificación de los discos (normalmente se seleccionan 5 clases o categorías).

Los discos de la primera y segunda clase son los que se sitúan en la cara exterior del tapón de vino espumoso y serán las que estarán en contacto con el vino espumoso, vino espumoso o champaña. En los discos casi siempre se diferencian las dos caras. Una máquina automática detecta la cara buena y marca la cara mala con un metal caliente, este proceso nos permite posteriormente adherir correctamente las arandelas a los mangos de aglomerados.

El proceso de elaboración de arandelas se resume en el Esquema núm. 2. (21, 97, 98)





ESQUEMA núm. 2

### 1.2.3. Tapones aglomerados y/o mangos para tapones de vino espumoso.

Para la fabricación de tapones aglomerados o mangos se procede de la siguiente manera:

No es adecuado cualquier tipo de corcho. El corcho que será válido para la fabricación de tapones de tapones aglomerados y/o mangos para tapones de vino espumoso, se obtiene de la siguiente materia prima: trozos cocidos, retales de preparación, lanas o virutas de corcho, rebanadas perforadas, retales de vientre y de espalda o leña fina.

Esta primera materia se dispone en molinos donde se tritura, obteniéndose serrín de diferentes medidas, posteriormente se clasifica en los tamices vibratorios donde hay mallas de diferentes *mesh*. Finalizada la clasificación en base a tamaño, se clasifica por densidad, obteniéndose el serrín con las características adecuadas para elaborar el aglomerado. El serrín se mantiene en sacos, con el fin de estabilizarlo hasta alcanzar una humedad entre el 5 y el 8%.

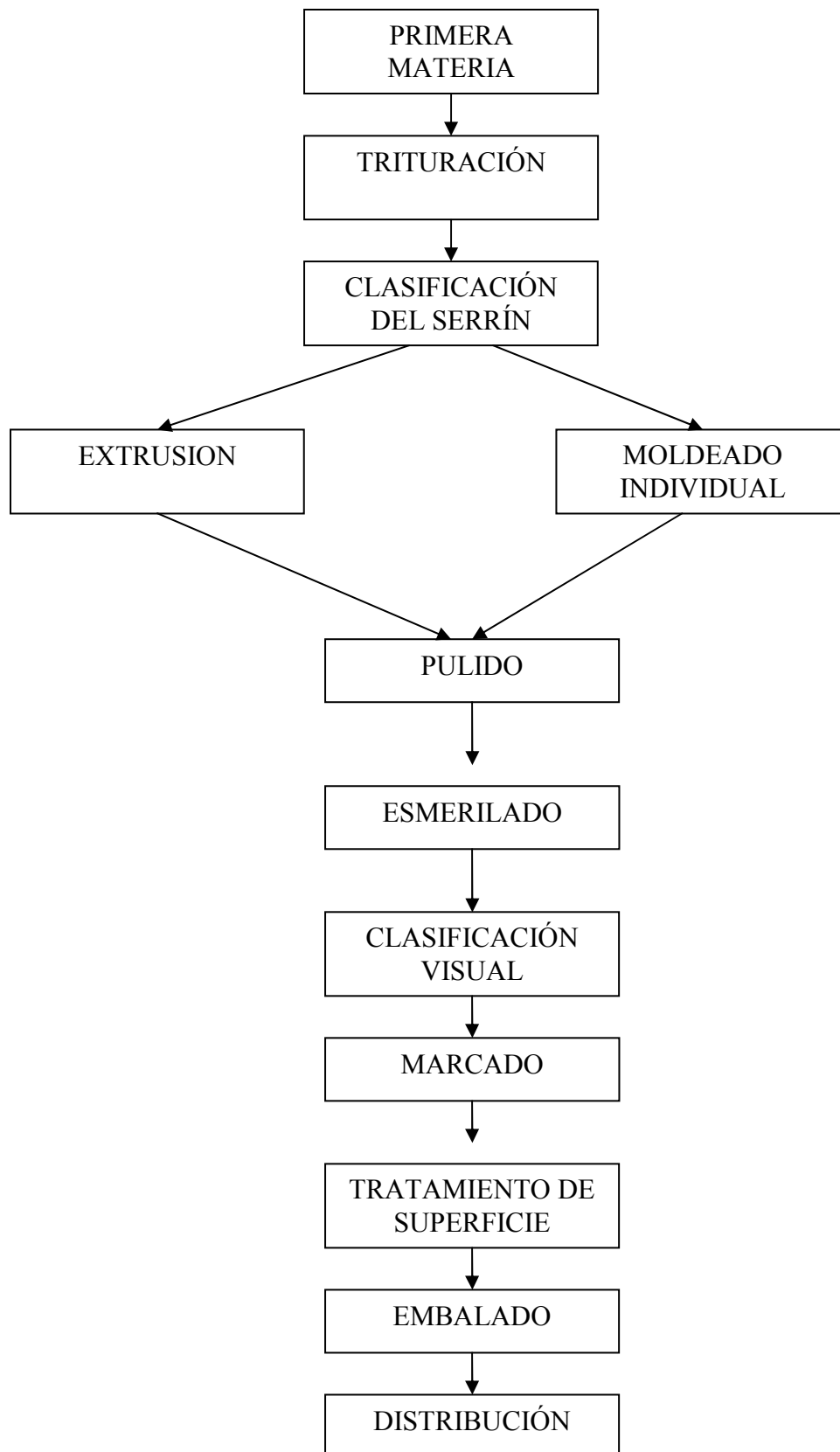
Cuando tenemos el serrín a la humedad indicada ya es apto para poderlo mezclar con las colas de poliuretano y parafina, evitando la adherencia de los aglomerados a los moldes.

Para fabricar los mangos se utilizan básicamente dos técnicas:

- A) **Extrusión:** la mezcla de granulado, aglutinante y lubricante se dispone en una tolva que alimenta un cilindro sometido cíclicamente a la presión de un pistón. Por el extremo contrario del cilindro vamos obteniendo una barra de aglomerado en forma continua (llamada butifarra) que estará lista después de un periodo de estabilización. Pasado este tiempo se pule lateralmente toda la barra y se corta, obteniéndose los mangos.
- B) **Moldeado individual:** la mezcla de granulado, cola y lubricante entra en un molde tubular que se compacta con la ayuda de un pistón, estos tubos se disponen en hornos para permitir la reticulación de la cola. Después se desmoldan y ya están listos para ser mecanizados. Se pulen los mangos uno a uno.

Para la elaboración de tapones aglomerados una vez extrusionado o moldeado de forma individual se procede al pulido y esmerilado, pasando posteriormente a la clasificación visual, al marcado y al tratamiento de superficie, para finalizar con el proceso de embalado y distribución según el Esquema núm.3.

En el caso de la elaboración de mangos se finaliza con la extrusión o con el moldeado individual y los mangos preparados pasan a formar parte del tapón para vino espumoso. (21, 97, 98)



ESQUEMA núm. 3

#### **1.2.4. Tapones para vino espumoso**

Cuando los mangos están preparados, se les adhieren dos arandelas, (se coloca la arandela de más calidad en la parte exterior) con cola y con la ayuda de aire caliente para que la cola se seque.

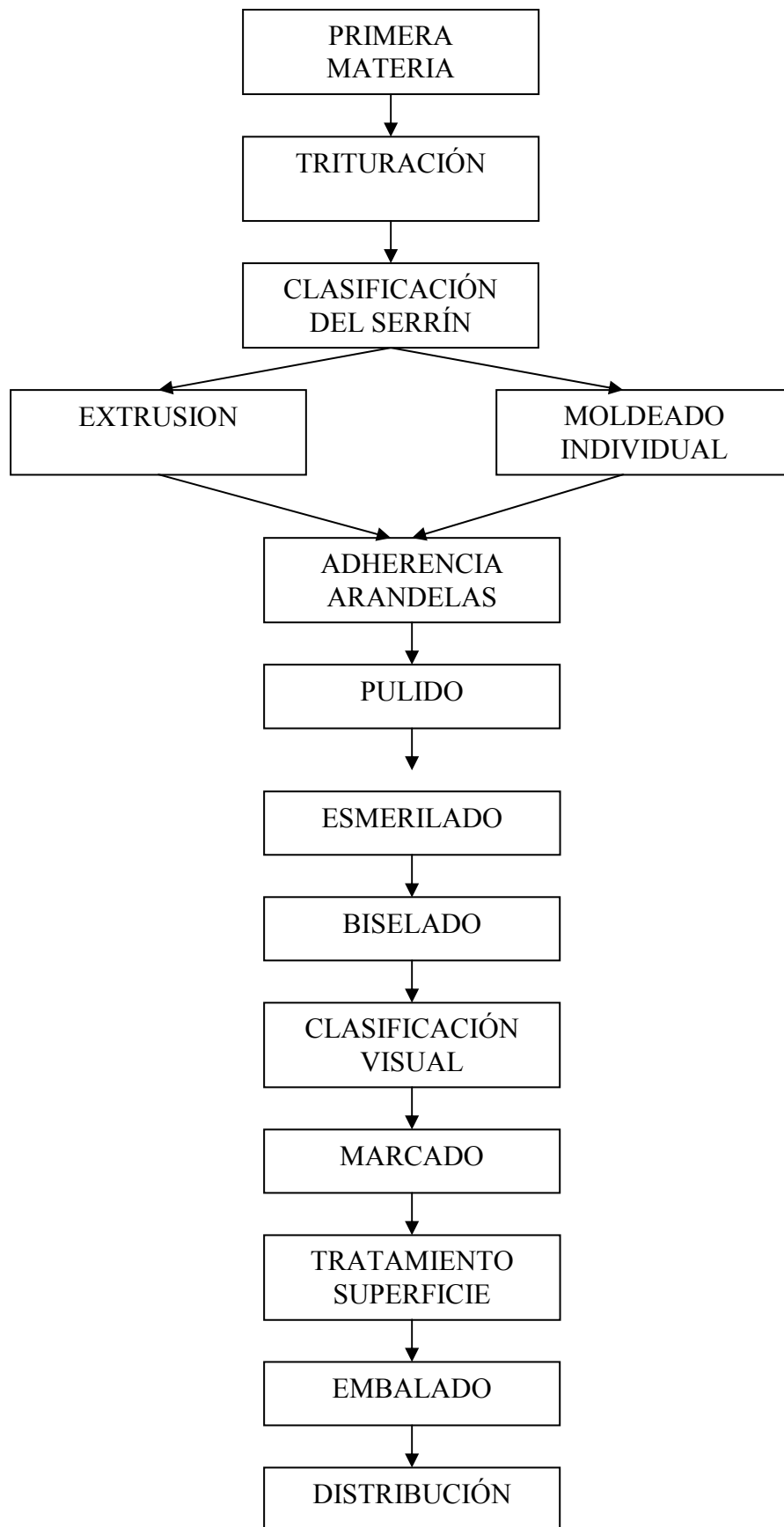
Estos tapones deben almacenarse en recipientes ventilados para que se aireen y se estabilicen sus dimensiones. El período de reposo dura entre 7 y 14 días.

Finalizado el período de reposo, se procede a pulir los tapones para obtener los diámetros con una precisión de  $\pm 0,5$  mm., exigida por la Norma y se esmerilan para obtener la longitud correcta.

Posteriormente se bisela la parte del mango para que las máquinas de tapar puedan situar los tapones de manera correcta y las arandelas estén en contacto con el vino espumoso.

Después se marca a fuego el logotipo o marca solicitado por cada cliente. A continuación se suavizan con silicona o parafina para facilitar el tapado y aumentar la estanqueidad y finalmente se seleccionan, se recuentan y se empaquetan.

El proceso de elaboración de tapones para vinos espumosos se resume en el Esquema núm. 4. (21, 97, 98)



ESQUEMA núm. 4

## 1.3.- MICROBIOLOGÍA DEL CORCHO

### 1.3.1. Microorganismos aislados del corcho

El corcho es un sustrato natural y de origen vegetal que constituye un buen hábitat para la proliferación de microorganismos, como consecuencia de ello es primordial realizar un control de la calidad microbiológica. (1, 90)

En las empresas del sector corchero se realiza un control microbiológico que consiste en el recuento de hongos y bacterias.

No existe ninguna Norma que determine los recuentos de cada especie particular de hongos filamentosos o de levaduras admitidas por tapón.



Contaminación fúngica en las arandelas

Otro aspecto a considerar es la posibilidad de que los hongos miceliares desarrollados elaboren y acumulen micotoxinas que puedan difundir y acumular en el sustrato (corcho). (7, 8, 16, 28, 44, 45, 75, 89)

Diversos autores han identificado las especies de hongos filamentosos, levaduras y bacterias más frecuentemente detectadas como constituyentes de la microbiota del corcho tanto como corteza del árbol como elaborado como tapón, en todas sus variantes (9, 10, 12, 15, 19, 26, 82, 83, 84, 85, 93).

En la Tabla siguiente se resumen los principales hongos filamentosos, levaduras y bacterias, aislados e identificados en tapones y arandelas de corcho.

**Tabla núm. 1.-** Relación de hongos filamentosos, levaduras y bacterias que se han identificado en el corcho.

### **HONGOS FILAMENTOSOS**

<i>Alternaria alternata</i>	<i>Penicillium brevi-compactum</i>
<i>Armillaria mellea</i>	<i>Penicillium citrinum</i>
<i>Aspergillus conicus</i>	<i>Penicillium citro-viride</i>
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Penicillium corylophilum</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>
<i>Aspergillus glaucus</i>	<i>Penicillium decumbens</i>
<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Penicillium echinulatum</i>
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium expansum</i>
<i>Aspergillus ruber</i>	<i>Penicillium fellutanum</i>
<i>Aspergillus sydowii</i>	<i>Penicillium frequentans</i>
<i>Aspergillus versicolor</i>	<i>Penicillium granulatum</i>
<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Penicillium lilacinum</i>
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Penicillium multicolor</i>
<i>Cladosporium herbarum</i>	<i>Penicillium purpurescens</i>
<i>Chrysonilia sithophila</i>	<i>Penicillium roqueforti</i>
<i>Fusarium moniliforme</i>	<i>Penicillium simplicissimum</i>
<i>Fusarium solani</i>	<i>Rhizopus arrhizus</i>
<i>Monilia sitophila</i>	<i>Scopulariosis candida</i>
<i>Mucor hiemalis</i>	<i>Trichoderma hamatum</i>
<i>Mucor plumbeus</i>	<i>Trichoderma longibranchiatum</i>
<i>Mucor racemosus</i>	<i>Trichoderma viride</i>
<i>Penicillium adametzi</i>	

### **LEVADURAS**

<i>Candida cifferi</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Candida famata</i>	<i>Saccharomyces italicus</i>
<i>Kluyveromyces veronae</i>	<i>Saccharomyces heterogenicus</i>
<i>Rhodotorula candida</i>	<i>Saccharomyces rouxii</i>
<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Saccharomyces ludwigii</i>
<i>Sporodiobolus johnsonii</i>	<i>Trichosporum pullulans</i>

## **BACTERIAS**

*Bacillus cereus*

*Bacillus circulans*

*Bacillus lentus*

*Bacillus firmus*

*Bacillus sedentarius*

*Achromobacter* spp.

*Aeromonas* sp

*Erwinia herbicola*

*Acinetobacter lwoffii*

*Streptomyces* spp.

*Bacillus pantothenicus*

*Nocardia* spp.

*Agrobacterium* spp.

*Micrococcus lylae*

*Micrococcus luteus*

*Corynebacterium* spp.

*Flavobacterium* spp.

*Kurthia* spp.

*Pseudomonas* spp.

*Listeria* spp.

(9, 10, 35, 77, 82, 83, 84, 85, 87, 103, 110)

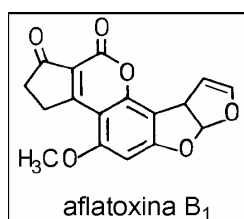
### **1.3.2. Micotoxinas**

Las micotoxinas son metabolitos secundarios, elaborados y acumulados por especies de hongos filamentosos.

La presencia de un hongo filamentosos no implica la producción de micotoxinas, ya que además de su capacidad intrínseca se deben dar condiciones específicas para que se produzca la formación de estos metabolitos, pero un hecho aún más significativo, es que si el hongo ha sido capaz de producir la micotoxina, puede ser posteriormente inactivado y perder su viabilidad, sin que las micotoxinas ya elaboradas sean alteradas ya que poseen una elevada resistencia a diferentes tratamientos químicos y a las altas temperaturas (22, 46, 54, 55, 86).

Las micotoxinas, en general, son muy termoestables y sobreviven fácilmente a los tratamientos.

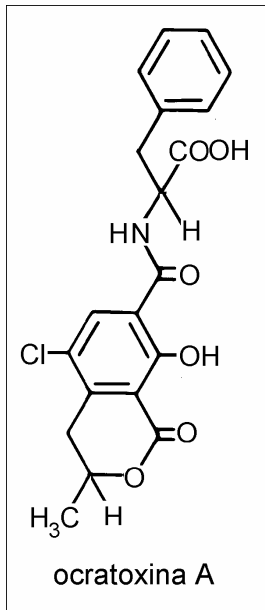
Las principales micotoxinas son:



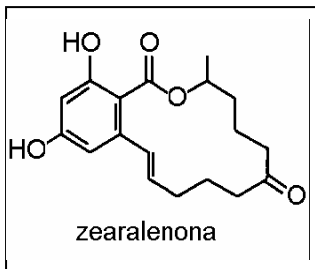
A) **Aflatoxinas**, se producen en los frutos secos, los cereales y el arroz en condiciones de humedad y de temperaturas elevadas y constituyen un riesgo para la salud humana. Las dos especies más importantes de *Aspergillus*, productoras de aflatoxinas son: *A. flavus* que produce aflatoxina B y *A. parasiticus* que produce aflatoxinas B y G.

Las aflatoxinas M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub> son metabolitos oxidados de las aflatoxinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> producidos por animales que después de la ingestión aparecen en la leche materna (tanto animal como humana) en la orina y en los excrementos. El aflatoxicol es un metabolito de la aflatoxina B<sub>1</sub>. Las aflatoxinas son compuestos con efectos tóxicos que pueden manifestarse de inmediato (intoxicación aguda), o bien desencadenar un proceso de intoxicación crónica por ser: inmunosupresoras, carcinogénicas, teratogénicas y mutagénicas. El principal órgano diana de los efectos tóxicos es el hígado (6, 54, 55, 60, 74, 78, 92, 106, 107, 111, 112, 118).

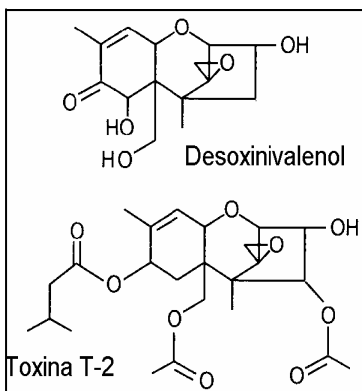




B) **Ocratoxinas**, son metabolitos secundarios de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* presentes en los cereales, en el café, en el pan y en todo tipo de productos alimentarios de origen animal. La más frecuente es la Ocratoxina A, que es la más tóxica. Se ha comprobado que es capaz de desencadenar procesos nefrotóxicos, inmunosupresores, carcinogénicos y teratogénicos en todos los animales de experimentación estudiados hasta el momento (37, 54, 55, 60, 74, 78, 92, 106, 107, 111, 112, 118). La ocratoxina A, se considera la representativa del grupo y su detección se considera como indicadora del mismo.

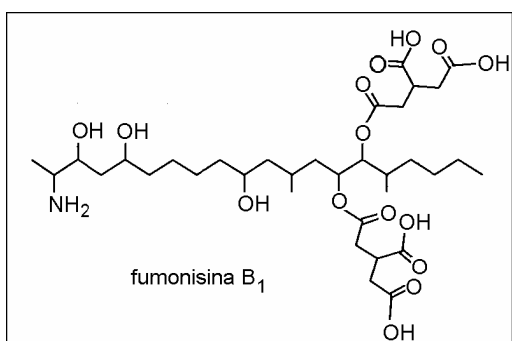


C) **Zearalenona**, elaborada y acumulada, principalmente por *Fusarium graminearum* y especies afines, fundamentalmente en trigo y maíz, pero también en sorgo, avena, y piensos compuestos. La zearalenona y sus derivados tienen efectos estrogénicos en varias especies animales (infertilidad, edema vulvar, prolapso vaginal e hipertrofia mamaria en hembras y feminización en varones con atrofia testicular y aumento del tamaño de las mamas) (54, 55, 56, 60, 74, 92, 106, 107, 111, 112, 118).



D) **Tricotecenos**, son micotoxinas producidas por hongos del género *Fusarium*, aunque también los sintetizan hongos de otros géneros como *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Myrothecium* y *Stachybotrys*. Se ha conseguido aislar 148 tricotecenos. Los más estudiados y evaluados son: desoxinivalenol (DON) conocido también como vomitoxina, nivalenol (NIV), diacetoxiscirpenol (DAS) y la toxina T-2 que es menos común.

Las manifestaciones habituales de la intoxicación por tricotecenos consisten en inmunodepresión y náuseas con vómitos (54, 55, 56, 60, 74, 78, 92, 106, 107, 111, 112, 118).



(54, 55, 60, 74, 92, 106, 107, 112, 118)

**E) Fumonisinas**, son micotoxinas producidas en todo el mundo por *Fusarium moniliforme* y especies afines cuando crece en el maíz. Tienen importancia toxicológica las fumonisinas B1 i B2, ya que las demás B3, B4, A1 y A2, aparecen en concentraciones muy bajas y son menos toxicas.

### 1.3.3 Relación micotoxinas – hongos miceliares.

Debe tenerse en cuenta que hasta el presente la capacidad de elaborar y acumular micotoxinas sólo se considera demostrada por parte de los hongos miceliares (96).

En la Tabla núm. 2, se relacionan las micotoxinas con los principales hongos productores y las especies de estos hongos aislados en el corcho (4, 25, 58, 104, 111, 120).

**Tabla núm. 2.-** Relación de micotoxinas legisladas para algún producto, hongo que las produce y hongos aislados del corcho.

MICOTOXINA	HONGO PRODUCTOR	HONGO AISLADO DEL CORCHO
Aflatoxinas	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus ostianus</i> <i>Aspergillus ruber</i> <i>Aspergillus wentii</i> <i>Penicillium citrinum</i> <i>Penicillium frequentans</i> <i>Penicillium puberulum</i> <i>Penicillium variabile</i>	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus ruber</i> <i>Penicillium citrinum</i> <i>Penicillium frequentans</i>
Ocratoxina A A	<i>Aspergillus ochraceus</i> (grupo) * <i>Aspergillus alliaceus</i> * <i>Aspergillus melleus</i> * <i>Aspergillus ostianus</i> * <i>Aspergillus petrakii</i> * <i>Aspergillus sclerotiorum</i> * <i>Aspergillus sulphureus</i> <i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Penicillium commune</i> <i>Penicillium cyclopium</i> <i>Penicillium palitans</i> <i>Penicillium purpurescens</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Penicillium purpurescens</i>

	<i>Penicillium variabile</i> <i>Penicillium verruculosum</i> <i>Penicillium viridicatum</i>	
Zearalenona = F-2 toxin	<i>Fusarium culmorum</i> <i>Fusarium equiseti</i> <i>Fusarium graminearum</i> (= <i>Fusarium roseum</i> = <i>Gibberella zae</i> ) <i>Fusarium lateritium</i> <i>Fusarium moniliforme</i> (= <i>Fusarium verticilloides</i> ) <i>Fusarium nivale</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Fusarium sacchari</i> var. <i>subglutinans</i> (= <i>Fusarium</i> <i>moniliforme</i> var <i>subglutinans</i> ) <i>Fusarium sporotrichioides</i> <i>Fusarium tricinctum</i> <i>Nectria radicola</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>
Patulina	<i>Aspergillus clavatus</i> <i>Aspergillus giganteus</i> <i>Aspergillus terreus</i> <i>Byssochlamys fulva</i> <i>Byssochlamys nivea</i> <i>Penicillium claviforme</i> <i>Penicillium cyaneofulvum</i> <i>Penicillium cyclopium</i> <i>Penicillium divergens</i> <i>Penicillium equinum</i> <i>Penicillium expansum</i> <i>Penicillium granulatum</i> <i>Penicillium griseofulvum</i> <i>Penicillium lanosum</i> <i>Penicillium lapidosum</i> <i>Penicillium leucopus</i> <i>Penicillium melinii</i> <i>Penicillium novae-zeelandiae</i> <i>Penicillium rivolii</i> <i>Penicillium roqueforti</i> <i>Penicillium urticae</i> (= <i>Penicillium patulum</i> )	<i>Penicillium granulatum</i> <i>Penicillium roqueforti</i>
Deoxinivalenol = vomitoxina	<i>Fusarium avenaceum</i> <i>Fusarium culmorum</i> <i>Fusarium equiseti</i> <i>Fusarium graminearum</i> (= <i>Fusarium roseum</i> ) <i>Fusarium moniliforme</i> <i>Fusarium nivale</i> <i>Fusarium poae</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>
Toxina HT-2 = Toxina T-2	<i>Fusarium avenaceum</i> <i>Fusarium equiseti</i> <i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium lateritium</i> <i>Fusarium nivale</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Fusarium poae</i> <i>Fusarium scirpi</i> <i>Fusarium solani</i>	

	<i>Fusarium sporotrichioides</i> <i>Fusarium tricinctum</i> <i>Trichoderma lignorum</i>	
Estaquibotriotoxina	<i>Stachybotrys alternans</i>	
Quetomina	<i>Chaetomium cochliodes</i> <i>Chaetomium globosum</i>	
Diacetoxiscirpenol = Anguidin	<i>Fusarium anguioides</i> <i>Fusarium avenaceum</i> <i>Fusarium culmorum</i> <i>Fusarium diversisporum</i> <i>Fusarium equiseti</i> <i>Fusarium rigidiusculum</i> <i>Fusarium sambucinum</i> <i>Fusarium scirpi</i> <i>Fusarium solani</i> <i>Gibberella intricans</i>	
Fumonisin	<i>Fusarium moniliforme</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>

#### 1.4. FACTORES CONDICIONANTES PARA EL DESARROLLO DE LOS HONGOS Y LA PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS

##### 1.4.1. Factores físicos

##### 1.4.1.1. Actividad del agua ( $a_w$ ).

Se define como la cantidad de agua libre o disponible para el desarrollo de los microorganismos. Es la relación existente entre la tensión de vapor de agua del sustrato y la del agua pura. Algunos ejemplos de valores de  $a_w$  que necesitan las diversas especies fúngicas y las que necesitan para producir micotoxinas se resumen en la Tabla núm. 3.

Tabla núm, 3.- Valores de  $a_w$  que precisan determinadas especies fúngicas para elaborar y acumular micotoxinas.

Especie	$a_w$	Producción micotoxina	$a_w$
<i>Aspergillus flavus</i>	0.78	Aflatoxinas	0.83
<i>Aspergillus parasiticus</i>	0.70	Aflatoxinas	0.80
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0.77	Ocratoxinas	0.90
<i>Penicillium expansum</i>	0.85	Patulina	0.95
<i>Penicillium granulosum</i>	0.83	Ocratoxinas	0.90
<i>Penicillium citrinum</i>	0.80	Citrinina	0.88

Podemos indicar que los hongos filamentosos necesitan para su desarrollo un valor mínimo de actividad de agua de 0.70, mientras que las bacterias necesitan valores de como mínimo 0.90. La producción de micotoxinas se ha observado que es muy baja y casi nula a una actividad del agua inferior a 0.85, mientras que el desarrollo de hongos definidos como toxicogénicos puede detectarse en un intervalo de actividad de agua inicial de 0.70 a 0.85 (11, 13, 14, 61, 62, 80, 119).

Según Chatonnet (17), el corcho presenta unos valores entre el 6 y el 8% de humedad relativa y en consecuencia su  $a_w$  se sitúa entre 0,50 y 0,60.

Cabe remarcar que en una de las fases del proceso de fabricación de los tapones de corcho, el corcho se hierve y se almacena en lugares cerrados y generalmente oscuros, en los que la humedad ambiental puede ser superior a 80% y la temperatura superior a 25°C, en estas condiciones la  $a_w$  del corcho será superior a los valores citados que favorecen la formación de micotoxinas.

#### **1.4.1.2. Temperatura.**

La temperatura óptima para el desarrollo de la mayoría de los hongos filamentosos oscila entre los 25° C y los 30°C, la mayoría de los hongos no se desarrollan a temperaturas inferiores a los 5°C ni superiores a los 45°C, mientras que en el caso de las micotoxinas la temperatura mínima necesaria para su producción varía según el tipo de micotoxinas (11, 13, 14, 60). Así por ejemplo, se precisa una temperatura mínima de 10°C, para la producción de Aflatoxinas y de Zearalenona, mientras que en el caso de Ocratoxinas y de Patulina, la producción se detecta entre 0°C y 24°C presentando un óptimo de producción a 12°C.

#### **1.4.1.3. Condiciones climatológicas.**

Según la estación del año, las condiciones que favorecen el desarrollo de la microbiota variarán (11, 54, 61).

### **1.4.2. Factores químicos**

#### **1.4.2.1. pH.**

Los hongos se desarrollan en condiciones óptimas en general en intervalos de pH del 2.5 al 7.5, por lo que crecer adecuadamente a pH ácido, en el que son capaces de elaborar y acumular micotoxinas (11, 54, 61).

#### **1.4.2.2. Composición del sustrato.**

Los hongos no son exigentes desde el punto de vista nutricional y se desarrollan perfectamente a expensas de los elementos presentes en el sustrato, pero la producción de micotoxinas se favorece por la presencia de lípidos y aceites así como de determinadas sales minerales entre las que destacan, las de Fe, Zn, Cu y Mg. La producción de aflatoxinas es dependiente de sustratos ricos en Zn y de ciertos aminoácidos. En el caso de las OCRATOXINA A son fundamentales para su producción las sales de Zn y de Cu (11, 61, 97).

En determinados tapones de corcho se observa la presencia de manchas de colores grises y/o azules, que se han asociado siempre a las sales minerales. En el corcho se han identificado 13 elementos: Ca, Mg, Fe, Al, K, Na, Ba, Mn, Sr, Li, Cu, Cr i Ti (Barceló, 1939) estos elementos fueron confirmados en 1954 por Marcos de Lanuza según especifica Pla, 1976 (97).

#### **1.4.2.3. Potencial de oxidación-reducción.**

La mayoría de los hongos son de respiración aeróbica y se ha comprobado que una atmósfera con un 20-40% de CO<sub>2</sub>, en combinación con una temperatura de unos 17°C disminuye la producción de aflatoxinas en substratos idóneos como los cacahuets. (11, 61)

### **1.4.3. Factores biológicos**

#### **1.4.3.1. Géneros específicos o productores de micotoxinas.**

La presencia de hongos productores de micotoxinas, es el factor limitante para la producción y la acumulación de las micotoxinas (11, 61).

#### **1.4.3.2. Presencia de otros organismos.**

Fundamentalmente insectos que favorecen la diseminación de los hongos, el metabolismo del insecto incrementa la humedad del substrato y favorece la entrada de hongos al interior del corcho por la producción de rupturas. Se puede asociar a la detección de carcoma, de canales realizados por acción de hormigas, entre otros (11, 61, 77).

### **1.5. Técnicas de detección de micotoxinas**

Los métodos de análisis se basan en técnicas cromatográficas fundamentalmente, en Cromatografía en capa fina (TLC) y en cromatografía líquida de alta presión (HPLC), aunque pueden utilizarse técnicas ELISA y otros métodos para la detección rápida de micotoxinas (95).

Los pasos para la detección de micotoxinas son:

- Toma de muestras
- Extracción
- Concentración del substrato
- Detección y cuantificación (TLC, HPLC, ELISA)
- Confirmación (54. 57)

## **1. 6. EL PROBLEMA DE LOS SABORES A CORCHO EN LOS VINOS EMBOTELLADOS**

La mayoría de las investigaciones referidas al corcho, llevadas a cabo durante estos últimos años, tienen por objetivo establecer la posible relación de las anomalías sensoriales detectadas en botellas de vino, fundamentalmente el denominado “sabor a corcho” con la existencia de diversos compuestos químicos como son:

- a) **2,4,6 tricloroanisol**
- b) **2,4,6 triclorofenol**
- c) **2,3,4,6 tetracloroanisol**
- d) **2,3,4,6 tetraclorofenol**
- e) **pentacloroanisol**
- f) **pentaclorofenol**
- g) **2,4,6 tribromoanisol**
- h) **1-octen-2-ona**
- i) **1-octen-3-ol**
- j) **2-metil isoborneol**
- k) **guaicol**
- l) **geosmina**
- m) **2 metoxi 3,5 dimetilpirazina**

Algunos de estos compuestos están presentes en el corcho de forma natural y otros se forman por la metilación de fenoles en anisoles a través de diversas rutas metabólicas de los hongos filamentosos.

Actualmente se llevan a cabo diversos estudios, con el fin de poder proponer métodos capaces de minimizar básicamente la presencia del 2, 4,6 triclorofenol y del 2, 4,6 tricloroanisol.

Los métodos propuestos fundamentalmente son:

- Aplicación de calor seco
- Tratamiento con radiaciones gamma
- Propuesta de utilización de fluidos supercríticos
- Control de cepas fúngicas con capacidad para degradar clorofenoles y cloroanisoles (2, 3, 20, 63, 76, 88, 102, 105).

## 1. 7. ASPECTOS LEGALES

La legislación vigente hasta el año 2003 decretada para las diferentes micotoxinas, los valores mínimos y máximos legislados, los productos para los cuales existe legislación y los países en los que es de obligado cumplimiento se resume en el Cuadro siguiente (6, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 54, 59, 113, 114, 115, 116, 117).

Relación de las micotoxinas indicando los valores máximos aceptados según los diversos sustratos y por países.

Micotoxinas	Valores máximos legislados (ng/g)	Productos implicados	Países
Aflatoxinas totales	1 – 30	Productos lácticos, piensos para animales, harinas. Todos los alimentos	Sri Lanka, Canadá, Méjico
Aflatoxina B <sub>1</sub>	0 – 1000	Alimentos infantiles y cacahuetes, maíz, soja. Arroz, aceites, leche de vaca, productos de la leche, cereales, piensos para animales, pistachos, almendras, cacao, cacao en polvo, chocolate, café, huevos, huevos deshidratados. Todos los alimentos.	Argentina, Austria, Bélgica, Brasil, Chile, China, Chequia, Egipto, Unión europea, Francia, Alemania, Grecia, Honduras, India, Irlanda, Israel, Italia, Japón, Luxemburgo, Malawi, Holanda, Nigeria, Noruega, Omán, Perú, Polonia, Portugal, Rumania, Rusia. El Salvador, Senegal, España, Surinam, Suecia, Suiza, Reino Unido, Zimbawe
Aflatoxina M <sub>1</sub>	0 – 5	Leche y derivados Alimentos infantiles	Argentina, Austria, Bélgica, Barbados, Chequia, Egipto, Francia, Alemania, Honduras, Israel, Holanda, Nigeria, Rusia, Suecia, Suiza, Uruguay USA, Rumania, Bulgaria, Mercosur
Aflatoxinas: B <sub>1</sub> + G <sub>1</sub>	0 – 10	Productos de maíz Pienso	Bosnia, Brasil, Macedonia, Serbia, Rep. Dominicana, Zimbabwe
Aflatoxinas: B <sub>2</sub> + G <sub>1</sub> + G <sub>2</sub>	0,2 – 10	Todos los alimentos	Austria, Chequia, Honduras, Suiza



Aflatoxinas: B <sub>1</sub> + B <sub>2</sub> + G <sub>1</sub> + G <sub>2</sub>	0 – 1000	Féculas y piensos, maíz, manteca de cacahuete, cacahuetes, alimentos para niños, cereales, frutos secos Todos los alimentos	Argentina, Australia, Bahamas, Barbados, Belice, Brasil, Bulgaria, Canadá, Chile, Colombia, Cuba, Chipre, Dinamarca, Egipto, Finlandia, Alemania, Grecia, Guatemala, Honduras, Hungría, Indonesia, Irlanda, Israel, Italia, Jamaica, Jordania, Kenia, Malasia, Mauricio, Mercosur, Méjico, Nueva Zelanda, Noruega, Perú, Filipinas, Rumania, El Salvador, Singapur, España, Surinam, Suecia, Suiza, Taiwan, Tailandia, Reino Unido, Uruguay, USA, Venezuela, Zimbawe
Aflatoxinas: B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> +G <sub>1</sub> +G <sub>2</sub> +M <sub>1</sub>	0.02	Alimentos para niños	Austria
Aflatoxinas: B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> +G <sub>1</sub> +G <sub>1</sub> +M <sub>1</sub> +M <sub>2</sub> +P <sub>1</sub> +aflatoxicol	15 – 20	Alimentos, cacahuetes	Hong – Kong
Fomopsina	5	Todos los alimentos	Austria
Ocratoxina A A	1 – 200	Alimentos para niños y piensos para aves, zumos y vinos	Austria, Brasil, Chequia, Dinamarca, Francia, Grecia, Israel, Rumania, Suiza, Suecia, Uruguay,
Zearalenona	30 – 1000	Alimentos, cereales	Austria, Brasil, Francia, Rumania, Rusia, Uruguay,
Patulina	20 – 50	Alimentos para niños, zumos de fruta	Austria, Chequia, Finlandia, Francia, Grecia, Israel, Noruega, Rumania, Rusia, Suecia, Suiza, Uruguay,
Deoxinivalenol	5 – 10000	Piensos	Austria, Canadá, Rumania, USA
Toxina HT-2 = toxina T-2	25- 100	Piensos, cereales	Canadá, Israel, Rusia
Estaquibotriotoxina	0	Piensos	Rumania
Quetomina	0	Piensos	Rumania
Fumonisinés B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub>	1000	Productos de maíz	Suiza
Diacetoxiscirpenol	1000	Piensos en grano	Israel
Todas las micotoxinas	0 – 0.5	Piensos para animales de reproducción, leche y derivados, conservas, cereales, legumbres, helados	Canadá, Chipre, Hungría, Holanda, Trinidad y Tobago

Actualmente existe regulación respecto a vinos, vinos espumosos y bebidas alcohólicas ya que se ha legislado la Ocratoxina A en vinos y el valor aceptado como máximo es de 2 ppb (32, 33, 43, 101, 121).

No existe ninguna legislación sobre micotoxinas en los tapones de corcho.

## **1.8.- NORMAS DEL SECTOR CORCHERO EN VIGOR QUE CONTEMPLAN LA MICROBIOLOGIA DE LOS DIFERENTES TIPOS DE TAPONES.**

Las normativas existentes relacionadas con la Microbiología del tapón de corcho son:

1. **NCS 0.10/95 “Tapones de corcho aglomerado con discos de corcho natural para vinos espumosos”**: En el apartado 6.6 se especifica el método de ensayo para el recuento de bacterias y de hongos filamentosos y levaduras y los límites admitidos son de inferior a 30 UFC/ tapón para las bacterias aerobias mesófilas revivificables y de inferior a 10 UFC/ tapón para los hongos filamentosos y levaduras (68).
2. **NCS 0.11/93 “Tapones de corcho aglomerado para vinos espumosos”**: En el apartado 7.4.5 se especifica el método de ensayo para el recuento de bacterias y de hongos filamentosos y levaduras y los límites admitidos son inferior a 30 UFC/ tapón para las bacterias aerobias mesófilas revivificables e inferior a 10 UFC/ tapón para los hongos filamentosos y las levaduras (64).
3. **NCS 0.12/93 “Tapones de corcho aglomerado para vinos tranquilos”**: En el apartado 6.11 se especifica el método de ensayo para el recuento de bacterias y de hongos filamentosos y levaduras y los límites admitidos son inferior a 30 UFC/ tapón para las bacterias aerobias mesófilas revivificables y inferior a 10 UFC/ tapón para los hongos filamentosos y las levaduras (65).
4. **NCS 0.20/95 “Tapones de corcho natural para vinos tranquilos”**: En el apartado 6.8 se especifica el método de ensayo para el recuento de bacterias y de hongos filamentosos y hongos y los límites admitidos son: inferior a 30UFC/ tapón para las bacterias aerobias mesófilas revivificables e inferior a 10 UFC/ tapón para los hongos filamentosos y levaduras (69).

5. **NCS 0.21/94 “Tapones de corcho natural semielaborados para vinos tranquilos”**: En el apartado 5.4 se especifica el método de ensayo para el recuento de bacterias y de hongos filamentosos y levaduras y los límites admitidos son inferior a  $10^5$  UFC/ tapón para los bacterias aerobias mesófilas revivificables e inferior a  $10^6$  UFC/ tapón para los hongos filamentosos y levaduras (66).
6. **NCS 0.22/94 “Discos de corcho natural para tapones para vinos espumosos”**: En el apartado 5.4 se especifica el método de ensayo para el recuento de bacterias y de hongos filamentosos y levaduras y los límites admitidos son inferior a  $10^5$  UFC/ tapón para las bacterias aerobias mesófilas revivificables e inferior a  $10^6$  UFC/ tapón para los hongos filamentosos y levaduras (67).
7. **NCS 0.23/96 “Tapones de corcho colmatados para vinos tranquilos”**: En el apartado 6.8 se especifica el método de ensayo para el recuento de bacterias y de hongos filamentosos y levaduras y los límites admitidos son inferior a 30 UFC/ tapón para las bacterias aerobias mesófilas revivificables e inferior a 10 UFC/ tapón para los hongos filamentosos y levaduras (70).
8. **UNE 56921 : 2003 “Tapones de corcho natural para vinos tranquilos. Métodos de ensayo y especificaciones.”**: En el apartado 5.10 se especifica el método que se utiliza para determinar el número de bacterias y de hongos filamentosos y levaduras admitidos por tapón. Para las bacterias aerobias mesófilas el límite esta fijado en inferior a 30 UFC /tapón mientras que para hongos y levaduras, el límite esta fijado en inferior a 10 UFC /tapón (5).
9. **UNE 56922: 1998 “Tapones de corcho aglomerado para vinos tranquilos. Métodos de ensayo y especificaciones.”**: En el apartado 4.9 se especifica el método de ensayo para el recuento de bacterias y de hongos filamentosos y levaduras y los limites admitidos son inferior a 30 UFC/ tapón para las bacterias aerobias mesófilas revivificables y inferior a 10 UFC/ tapón para los hongos filamentosos y las levaduras (5).
10. **UNE 56923: 1998 “Tapones de corcho aglomerado con discos de corcho natural para vinos espumosos. Métodos de ensayo y especificaciones “**: En el apartado 5.6 se especifica el método de ensayo para el recuento de bacterias y de hongos filamentosos y levaduras y los límites admitidos son inferior a 30 UFC/ tapón para las bacterias aerobias mesófilas revivificables y inferior a 10 UFC/tapón para los hongos filamentosos y las levaduras (5).

11. **UNE 56924: 1998 “ Tapones de corcho colmatados para vinos tranquilos, Métodos de ensayo y especificaciones”**: En el apartado 5.8 se especifica el método de ensayo para el recuento de bacterias y de hongos filamentosos y levaduras y los límites admitidos son inferior a 30 UFC/ tapón para bacterias aerobias mesófilas revivificables y inferior a 10 UFC/ tapón para hongos filamentosos y levaduras (5).
  
12. **UNE 56925:2000 “Tapones de corcho natural de dos piezas para vinos tranquilos. Métodos de ensayo y especificaciones”**: En el apartado 5.7 se especifica el método de ensayo para el recuento de bacterias y de hongos filamentosos y levaduras y los límites admitidos son: inferior a 30 UFC/tapón para las bacterias aerobias mesófilas revivificables e inferior a 10 UFC/ tapón para los hongos filamentosos y levaduras (5).
  
13. **UNE 56926: 2001 “ Tapones de corcho de tres piezas. Métodos de ensayo y especificaciones “** : En el apartado 4.9 se especifica el método de ensayo para el recuento de las bacterias y de los hongos filamentosos y levaduras y los límites admitidos son inferior a 30 UFC/ tapón para las bacterias aerobias mesófilas revivificables y inferior a 10 UFC/ tapón para los hongos filamentosos y levaduras (5).
  
14. **ISO 10718/2002 Enumeration of colony-forming units of yeast, moulds and bacteria capable of growth in an alcoholic medium** (71).

Esta legislación solo regula el recuento de microorganismos totales, no existen, por el momento, normativas respecto a la identificación de bacterias ni de hongos filamentosos ni levaduras ni tampoco a la detección y cuantificación de micotoxinas (53, 72).

## OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

## **2.- OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO**

### **2.1. OBJETIVOS**

El objetivo fundamental de esta Tesis es determinar la posible capacidad de los hongos filamentosos aislados de tapones del corcho de elaborar y acumular micotoxinas, capaces de ser transferidas a los vinos en contacto con los tapones.

Las hipótesis de trabajo planteadas son:

**H<sub>0</sub>**: Los hongos presentes en los tapones de corcho son capaces de elaborar y acumular micotoxinas que difunden al vino.

**H<sub>1</sub>**: Los hongos presentes en los tapones de corcho no son capaces de elaborar ni acumular micotoxinas que difunden al vino.

Los objetivos específicos de esta investigación se resumen en:

- 1.- Aislar e identificar los hongos presentes en los tapones de corcho
- 2.- Definir y adaptar una metodología que permita cuantificar las posibles micotoxinas desarrolladas y acumuladas en los tapones de corcho
- 3.- Proponer criterios de calidad micológica de tapones de corcho.

## 2.2. PLAN DE TRABAJO

Para poder alcanzar los objetivos planteados se ha establecido el siguiente **Plan de Trabajo**:

- 1.- Revisión exhaustiva de la bibliografía sobre corcho con especial énfasis en los aspectos microbiológicos y en la legislación sobre micotoxinas en sustratos destinados a alimentación o para-alimentarios.
- 2.- Obtención de muestras de tapones a partir del sector corchero catalán.
- 3.- Establecer las condiciones del medio de cultivo para lograr el óptimo recuento de la microbiota presente en tapones de corcho.
- 4.- Identificación de las cepas fúngicas aisladas con especial énfasis en las capaces de elaborar y acumular micotoxinas.
- 5.- Elección y adaptación de métodos para detección de micotoxinas a partir del corcho.
- 6.- Detección de actividades inhibitoras de los hongos aislados sobre otros microorganismos.
- 7.- Inoculación de hongos productores de micotoxinas en tapones de corcho.
- 8.- Recuento de hongos recuperados y detección de micotoxinas.
- 9.- Evaluación de la migración de las micotoxinas inoculadas.
- 10.- Evaluación, mediante las técnicas investigadas de tapones de mercado.
- 11.- Propuesta de Criterios de calidad micológica para los tapones de corcho.





### **3.- MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1- TAPONES DE CORCHO**

El material básico de estudio para la realización de esta Tesis han sido los tapones de corcho.

En la Tabla núm. 4, se resumen los tipos y cantidad de tapones utilizados.

**Tabla núm. 4.-** Relación de tapones analizados.

<b>TIPO DE TAPÓN</b>	<b>NÚMERO DE TAPONES</b>
TAPÓN AGLOMERADO	584
TAPÓN DE VINO TRANQUILO	584
TAPÓN DE VINO ESPUMOSO	584

#### **3.2. MÉTODOS**

Las diversas metodologías aplicadas en el desarrollo de la Tesis así como los materiales precisos para el desarrollo de las mismas se describen a continuación en forma de fichas de Protocolo de Trabajo, para facilitar su aplicación a nivel industrial.

### **3.2.1. Método para el recuento de hongos presentes en tapones de corcho** **REF: MET 01**

#### **Objetivo:**

Establecer el recuento de hongos filamentosos y levaduras presentes en los diferentes tipos de tapones de corcho analizados.

#### **Material:**

Tapones de corcho (para vino tranquilo, para aglomerados y para vino espumoso)  
Solución salina estéril al 0,9 %  
Agua destilada  
Frascos de vidrio de 500 mL tipo twist-off  
Placas de Petri  
Medio de cultivo: Agar glucosado de Sabouraud adicionado de 30 ppm de clorhidrato de tetraciclina  
Autoclave  
Bomba de vacío  
Agitador  
Filtros estériles de 0,45 µm de porosidad.  
Equipo de vidrio para filtración.  
Estufas para incubación.  
Papel de aluminio.

#### **Método:**

Preparar una solución salina al 0,9% con cloruro de sodio y se reparte en los frascos de vidrio de 500 mL.

Preparar el medio de cultivo: agar glucosado de Sabouraud, siguiendo las indicaciones del fabricante, en un frasco de vidrio de 500 mL.

Disponer en el autoclave, los frascos de vidrio de 500 mL. con la solución salina y el frasco con del medio de cultivo. Asimismo se introduce en el autoclave, el equipo de filtración envuelto con papel de aluminio. Se programa el autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Cuando el autoclave ha finalizado su ciclo, los frascos con solución salina, se dejan a temperatura ambiente hasta que se atemperen.

El medio de cultivo se acondiciona a 42-44°C y se adicionan 30 ppm de clorhidrato de tetraciclina, previamente esterilizados por filtración, con el fin de inhibir el desarrollo bacteriano. Se homogenizan el medio de cultivo y el antibiótico y se dispensa en placas de Petri que se dejan reposar hasta su completa solidificación.

Cuando los frascos de solución salina han alcanzado la temperatura ambiente se introducen 2 tapones en cada frasco y se disponen en el agitador a 150 rpm durante treinta minutos. Para cada tipo de tapón (para vino tranquilo, aglomerado o vino espumoso) se realizan 2 replicas más.

Pasado este período de tiempo, se filtra el contenido de cada frasco a través de un filtro de estéril de 0,45  $\mu\text{m}$ . Finalizado el proceso, se deposita el filtro en una placa de Petri que contiene el medio de agar Sabouraud.

Las placas de Petri se disponen en una estufa para incubación a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 3 días.

Transcurrido este tiempo se procede al recuento de hongos filamentosos y levaduras que se han desarrollado sobre los filtros incubados.

### **3.2.2. Método para aislamiento de hongos.**

**REF: MET 02**

#### **Objetivo:**

Obtener un cultivo axénico de cada especie de hongo filamentoso y levadura aislada a partir de los diferentes tipos de tapones de corcho analizados.

#### **Material:**

Placas de Petri con los hongos desarrollados a partir de tapones de corcho  
Tubos de ensayo  
Medio de cultivo: Agar glucosado de Sabouraud  
Agua destilada  
Asa de Nicrom  
Autoclave  
Estufas para incubación.

#### **Método:**

Preparar agar glucosado de Sabouraud, siguiendo las indicaciones del fabricante, en tubos de ensayo a razón de 5 mL por tubo.

Disponer y esterilizar en el autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Transcurrido el proceso de esterilización dispone los tubos en forma inclinada hasta la solidificación del medio de cultivo.

Mediante el asa de Nicrom esterilizada se separa un fragmento de la colonia fúngica previamente desarrollada en placas de Petri que se siembra en uno de los tubos de ensayo que contiene el agar Sabouraud.

Se repite el procedimiento con cada uno de los diversos hongos aislados a partir de los tapones de corcho analizados.

Se incuban los tubos de ensayo sembrados en una estufa a 28°C durante 3 días.

### **3.2.3. Método para identificación de hongos filamentosos hasta nivel de género** **REF: MET 03**

#### **Objetivo:**

Identificar los géneros de hongos filamentosos aislados de los diferentes tipos de tapones de corcho.

#### **Material:**

Placas de Petri con cultivo axénicos en medios de cultivo de agar extracto de malta al 2% y en Agar Czapeck Tween 80, al 0.3%  
Microscopio óptico con objetivo de inmersión  
Aceite de inmersión  
Portaobjetos  
Cubreobjetos  
Agujas enmangadas.

#### **Método:**

A partir de los cultivos obtenidos, anotar las características macroscópicas de las colonias desarrolladas.

Mediante las agujas enmangadas, obtener un fragmento de las colonias desarrolladas y resuspenderlo en Tween 80, al 0.3%. Depositar los fragmentos entre porta y cubreobjetos. Proceder a su observación bajo microscopio óptico. Anotar características.

A partir de las características observadas y cuantificadas y siguiendo los tratados específicos para cada género, proceder a la identificación hasta nivel de género de las colonias en estudio.

### **3.2.4. Método para el desarrollo de hongos para su identificación hasta nivel de especie.**

**REF: MET 04**

#### **Objetivo:**

Obtener un cultivo axénico de cada cepa fúngica aislada a partir de los tapones de corcho analizados, en medios de cultivo específicos para facilitar su identificación hasta nivel de especie.

#### **Material:**

Tubos de ensayo con los cultivos axénicos de los hongos recuperados a partir los tapones de corcho

Medio de cultivo: Agar extracto de malta al 2%, Agar Czapeck

Agua destilada

Tween 80, al 0.3 %

Autoclave

Estufas para incubación.

Asa de Nicrom

#### **Método:**

Preparar los medios de cultivo: agar extracto de malta al 2% y agar Czapeck, siguiendo las indicaciones del fabricante, en un frasco de vidrio de 500 mL. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Cuando el autoclave ha finalizado su ciclo, disponer 15 mL a cada placa de Petri del medio de cultivo y dejar solidificar a temperatura ambiente.

Mediante asa de Nicrom previamente esterilizada se prepara una suspensión de cada cepa fúngica a identificar en un tubo de ensayo que contiene una solución Tween 80 al 0,3 %. Se agita la suspensión y se procede a su inoculación en el medio de cultivo adecuado: agar Czapeck y agar extracto de malta al 2% para la identificación hasta nivel de especie de cepas de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* y sólo en agar extracto de malta al 2% para las restantes cepas.

En el caso de las cepas de *Penicillium* y *Aspergillus* la siembra se realiza en tres puntos, depositando la suspensión preparada en Tween, formando los tres vértices de un triángulo equilátero, con el fin de obtener el desarrollo de tres colonias en el medio de cultivo.

Las placas preparadas se incuban en posición invertida por un período de tiempo comprendido entre 10 y 14 días a 28°C.

### 3.2.5. Método para detectar la actividad inhibitoria de hongos habitualmente presentes en tapones de corcho.

REF: MET 05

#### **Objetivo:**

Determinar el grado de capacidad inhibitoria de crecimiento de otros microorganismos que presentan cepas de hongos filamentosos habitualmente presentes en tapones de corcho.

#### **Material:**

Placas de Petri con cultivo axénico de *Monilia sitophila*  
Placas de Petri con cultivo axénico de *Aspergillus niger*  
Placas de Petri con cultivo axénico de *Aspergillus flavus*  
Placas de Petri con cultivo axénico de *Penicillium citrinum*  
Placas de Petri con cultivo axénico de *Penicillium frequentans*  
Placas de Petri con cultivo axénico de *Penicillium purpurescens*  
Placas de Petri con cultivo axénico de *Aspergillus ochraceus*  
Placas de Petri con cultivo axénico de *Fusarium moniliforme*  
Estufa de cultivo

#### **Método:**

A partir de cultivos axénicos de siete días de cada una de las cepas en estudio, se obtienen en condiciones de esterilidad discos de cultivo de 6 mm de diámetro.

Los discos de cada uno de los cultivos se depositan sobre placas de Petri de agar glucosado de Sabouraud que se inoculan previamente con cada uno de los cultivos en estudio.

Las placas se incuban en estufa a 28°C por espacio de siete días. Transcurrido este periodo de tiempo se establece la capacidad inhibitoria de cada una de las cepas en estudio sobre las restantes, midiendo el valor del halo de inhibición observado alrededor de cada uno de los discos de cultivo depositados.

Con el fin de poder comparar las inhibiciones detectadas se aplica la fórmula siguiente:

$$\frac{\text{Diámetro de la inhibición observada} - \text{Diámetro del disco de cultivo (6mm)}}{2}$$

El resultado obtenido se denomina valor de inhibición: VI

### **3.2.6.- Método para la determinación de la actividad enzimática de hongos habitualmente presentes en tapones de corcho.**

**REF: MET 06**

#### **Objetivo:**

Valorar la actividad enzimática de hongos habitualmente presentes en tapones de corcho.

#### **Material:**

Suspensiones de conidios fúngicos de concentración  $10^6$  UFC/mL de suero fisiológico estéril, a partir de cultivos puros en AEM con 7 días de incubación a 28°C

Galerías y reactivos APY ZYM<sup>®</sup>

#### **Método:**

Se evaluó la actividad enzimática de los microorganismos mediante el sistema API ZYM<sup>®</sup> con el cual se pueden estudiar 19 actividades enzimáticas a través de 20 cúpulas preparadas con substratos enzimáticos tamponados.

Las enzimas investigadas por orden numérico se detallan a continuación:

1. Control negativo
2. Fosfatasa alcalina
3. Esterasa (C1)
4. Esterasa lipasa (C8)
5. Lipasa (C14)
6. Leucina arilamidasas
7. Valina arilamidasas
8. Cistina arilamidasas
9. Tripsina
10.  $\alpha$ -quimotripsina
11. Fosfatasa ácida
12. Naftol-A-S-BI-fosfohidrolasa
13.  $\alpha$ -galactosidasa
14.  $\beta$ -galactosidasa
15.  $\beta$ -glucosidasa
16.  $\alpha$ -glucosidasa
17.  $\beta$ -glucosidasa
18. N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasa
19.  $\alpha$ -manosidasa
20.  $\alpha$ -flucosidasa



Se añadieron 65  $\mu$ l de las suspensiones celulares en cada cúpula, se incubaron las galerías a 28°C durante 4 horas. Al finalizar este tiempo, se añadió una gota del reactivo API ZYM A y una gota del reactivo API ZYM B en cada cúpula.

La lectura de los resultados se efectúa de acuerdo a la intensidad del color de la reacción.

Los resultados obtenidos son semi-cuantitativos y puede establecerse la siguiente escala de valoración:

- 0 = reacción negativa**
- 0,5 = 2,5 nanomoles**
- 1 = 5 nanomoles**
- 2 = 10 nanomoles**
- 3 = 20 nanomoles**
- 4 = 30 nanomoles**
- 5 > 30 nanomoles**



**GALERIA API ZYM®**

**3.2.7. Método determinación del pH de los tapones de corcho.  
REF: MET 07**

**Objetivo:**

Determinar el pH de los diferentes tipos de tapones de corcho.

**Material:**

Tapones de corcho  
Agua destilada  
Fascos de vidrio

**Método:**

A partir de 10 muestras de tapones de diferentes tipos y se procede a sumergirlos en agua destilada en 10 fascos.

Previamente se controla el pH del agua destilada.

Los fascos se mantiene a temperatura ambiente y se anota el pH del agua destilada que en contacto con los tapones a las 24 horas, a las 48 horas, a las 72 horas y al cabo de una semana de iniciado el estudio.

### **3.2.8. Método de esterilización de los tapones de corcho**

**REF: MET 08**

#### **Objetivo:**

Eliminar la microbiota de los diferentes tipos de tapones de corcho, para poder proceder a estudios controlados tras inoculación selectiva con diversos microorganismos.

#### **Material:**

Tapones de corcho (naturales para vino, aglomerados y de vino espumoso)  
Frascos de vidrio de 1.000 mL aptos para autoclave, con tapón.  
Autoclave

#### **Método:**

Disponer 10 tapones de cada uno de los tres tipos en los frascos de vidrio y proceder a su esterilización en autoclave a 126° C durante 20 minutos.

### **3.2.9. Método para el cálculo del diámetro de los tapones de corcho esterilizados** **REF: MET 09**

#### **Objetivo:**

Verificar el diámetro y sus posibles modificaciones después de esterilizar los diferentes tipos de tapones de corcho.

#### **Material:**

Tapones de corcho (naturales para vino, aglomerados y para vino espumoso)  
Pie de rey digital con rango de 0 a 150 mm. (calibrado) y de precisión  $\pm 0,01$  mm.

#### **Método:**

##### **Para tapones naturales:**

A partir de tapones naturales para vino tranquilo, se obtienen dos medidas en cada una de las caras del tapón, una en sentido paralelo a las venas de crecimiento y otra en sentido perpendicular. Se anota la diferencia entre las dos medidas de cada una de las caras así como si se observa alguna deformación en los tapones. (5, 69)

##### **Para los tapones aglomerados:**

Se realiza el mismo sistema de medición que para los tapones naturales para vino tranquilo. (5, 64, 65)

##### **Para los tapones de vino espumoso:**

Se mide la parte central del tapón llevando a cabo dos lecturas a  $90^\circ$  (5, 68)

**3.2.10. Método para el cálculo de la longitud de los tapones de corcho esterilizados.**  
**REF: MET 10**

**Objetivo:**

Verificar la longitud y evidenciar las posibles modificaciones después de esterilizar los diferentes tipos de tapones corcho.

**Material:**

Tapones de corcho (naturales para vino, aglomerados y para vino espumoso)  
Pie de rey digital con rango de 0 a 150 mm. (calibrado) y de precisión  $\pm 0,01$  mm.

**Método:**

Medir la altura o longitud de los diversos tipos de tapones evaluados, tomando una medida en el eje de simetría mediante el pie de rey y anotando cualquier modificación o deformación observada. (5, 64, 65, 66, 68, 69)

**3.2.11. Método para el cálculo de la humedad en los tapones de corcho esterilizados**  
**REF: MET 11**

**Objetivo:**

Verificar la humedad y evidenciar las posibles modificaciones después de esterilizar los diferentes tipos de tapones de corcho.

**Material:**

Tapones de corcho (naturales para vino, aglomerados y para vino espumoso)  
Humidiómetro específico equipado con sonda de dos electrodos Aquaboy KOM IV (2 al 10 %) (calibrado).

**Método:**

Se basa en la medida de la conductividad eléctrica entre dos electrodos.

**Para tapones naturales:**

Se introducen las dos agujas del electrodo a una profundidad de entre 4 y 6 mm, en la parte media de los tapones de corcho natural para vino de forma que el plano formado por éstas sea perpendicular a las líneas de crecimiento y se anota el valor evidenciado. (5, 69)

**Para los tapones aglomerados:**

En el caso de los tapones aglomerados se procede de igual forma pero introduciendo los electrodos en uno de los extremos del tapón. (5, 64, 65)

**Para los tapones de vino espumoso:**

Para los tapones de vino espumoso se realiza una lectura en las arandelas y otra en el mango de aglomerado. (5, 68)

**3.2.12. Método para el cálculo de la densidad de los tapones de corcho esterilizados**  
**REF: MET 12**

**Objetivo:**

Verificar la densidad y sus posibles modificaciones después de esterilizar los diferentes tipos de tapones de corcho.

**Material:**

Tapones de corcho (naturales para vino, aglomerados y para vino espumoso)  
Balanza analítica de precisión (0,0001 g.)

**Método:**

Se pesan todos los tapones y se mide el diámetro y la longitud según los métodos de referencia: REF: MET 10 y REF: MET11 y después se procede a calcular la densidad aplicando la fórmula:

$$D = 4 \times 10^6 \times m / \pi \times d^2 \times l$$

D = densidad aparente en kg/m<sup>3</sup>

M = masa en gramos

d = diámetro medio

L = longitud

(5, 69)

### **3.2.13. Método para el cálculo de la fuerza de extracción de los tapones de corcho esterilizados**

**REF: MET 13**

#### **Objetivo:**

Verificar la fuerza de extracción y evidenciar sus posibles modificaciones después de esterilizar tapones de corcho para vino.

#### **Material:**

Tapones de corcho (naturales para vino, aglomerados y para vino espumoso)

Dinamómetro con las siguientes características:

- Capacidad mínima 100 daN
- Precisión de lectura  $\pm 0,1$  daN
- Velocidad de desplazamiento 30 mm/minuto.

Sacacorchos que debe tener las siguientes características:

- Varilla helicoidal de acero inoxidable.
- Paso de hélice comprendido entre 12 mm y 14 mm.
- Longitud útil superior a 50 mm.
- Número de espiras entre 5 y 6
- Diámetro interno mínimo de 3 mm.
- Diámetro externo comprendido entre 10 mm. y 15 mm.

Botellas con las siguientes características:

- diámetro interior del gollete a 3 mm. de la botella ( $18,5 \pm 0,5$  mm.)
- diámetro interior del gollete a 45 mm. de la botella ( $20,0 \pm 1,0$  mm.)

#### **Método:**

Se introducen los tapones de naturales para vino tranquilo y los aglomerados en botellas de vino, llenas de vino, se mantienen 5 minutos en posición vertical y seguidamente se disponen en posición horizontal durante 24 horas.

Posteriormente se introduce el sacacorchos en los tapones y se calcula la fuerza necesaria para extraer los tapones a través del dinamómetro. Se anota la fuerza máxima (5, 69).



**3.2.14. Método para el cálculo de la tensión de rotura por torsión de los tapones de corcho esterilizados**  
**REF: MET 14**

**Objetivo:**

Verificar la tensión de rotura por torsión y evidenciar sus posibles modificaciones después de la esterilización de los tapones de corcho para vino espumoso.

**Material:**

Tapones de corcho para vino espumoso  
Máquina para la medida del momento de torsión, dotada de dos mordazas para la fijación del tapón que impidan el desplazamiento relativo de éste, con una precisión de  $\pm 0,1$  daN/cm

La separación entre mordazas debe ser de:

- de 11 mm. si la longitud nominal del tapón es inferior a 38 mm.
- de 17 mm. si la longitud nominal del tapón es superior o igual a 38 mm.

La distancia entre las secciones de fijación no deberá variar durante el ensayo.  
La velocidad de giro estará comprendida entre 4 rpm y 6 rpm.

**Método:**

Fijar el tapón de vino espumoso a las mordazas de la máquina.  
Girar una mordaza respecto a la otra con una velocidad comprendida entre 4 rpm y 6 rpm hasta la rotura del tapón.  
Anotar el momento de torsión de rotura.  
La tensión por rotura se obtendrá de la aplicación de la fórmula:

$$T = 16 \times M / \pi \times D^3$$

En la que:

T = tensión de rotura en daN/cm<sup>2</sup>  
M = momento de torsión de rotura en daN/ cm  
D = diámetro del tapón en cm  
(5, 68)

### **3.2.15. Método para determinar la concentración de las suspensiones de los hongos filamentosos**

**REF: MET 15**

#### **Objetivo:**

Establecer la concentración inicial de las diversas especies de hongos filamentosos para su inoculación en los diferentes tipos de tapones de corcho.

#### **Material:**

Placas de Petri inoculadas con las diferentes especies de hongos.  
Frascos de vidrio de 250 mL tipo *twist-off*, con tapón.  
Solución salina al 0,9 %  
Tubos de ensayo  
Placas de Petri con Agar glucosado de Sabouraud  
Autoclave  
Frigorífico  
Estufa de cultivo

#### **Método:**

Se disponen 100mL de solución salina al 0,9 % en cada uno de los frascos de 250 mL, se tapan y se esterilizan en el autoclave a 120°C durante 20 minutos.

Al mismo tiempo se prepara un banco de diluciones para cada una de las especies fúngicas.

Seguidamente se toman cinco placas de Petri con medio de cultivo Sabouraud y se siembran 0,1 mL. de cada uno de los tubos del banco de diluciones de cada especie de hongo.

Las placas se incuban 28°C durante 3 días.

Pasado este período de tiempo se procede al recuento de las placas sembradas para cada una de las cepas de hongos, estableciendo la concentración de cada cepa fúngica expresada en UFC/mL que se mantienen en tubos de ensayo y en nevera.

**3.2.16. Método para la inoculación por inmersión de diferentes hongos en los tipos de tapones de corcho**  
**REF: MET 16**

**Objetivo:**

Inocular cepas fúngicas de forma controlada en los diferentes tipos de tapones de corcho en estudio.

**Material:**

200 mL de suspensión valorada de las diversas cepas fúngicas que se desea inocular .  
Tapones de corcho (20 de natural para vino tranquilo y 20 de vino espumoso) previamente esterilizados y controlados.  
2 litros de solución salina estéril al 0,9 %  
2 Erlenmeyers de 2000 mL.  
Agitador

**Método:**

Se disponen tapones para vino tranquilo en un Erlenmeyer de 2.000 mL con 900 mL de solución salina estéril. Se añaden 100 mL de una suspensión de la cepa fúngica valorada. Agitar durante 4 horas a 250 rpm.

Se procede de igual forma con los tapones para vino espumoso, pero con 700 mL. de solución salina estéril

Pasadas las cuatro horas, se procede a evaluar la concentración de hongos que persisten en el la suspensión en contacto con los tapones así como a realizar el ensayo microbiológico para poder establece la concentración de hongos que han impregnando los tapones.

Los tapones inoculados se mantienen en frascos estériles y se establece un seguimiento de la micobiota presente a los 7, 12 y 21 días después de la inoculación experimental.

**3.2.17. Método para la cuantificación de hongos en los diferentes tipos de tapones de corcho inoculados**  
**REF: MET 17**

**Objetivo:**

Determinar cualitativa y cuantitativamente las diferentes especies de hongos filamentosos capaces de colonizar los diferentes tipos de tapones de corcho después de la inoculación.

**Material:**

Tapones de corcho inoculados con diferentes hongos  
Líquido inoculante  
Banco de diluciones con solución salina estéril al 0,9 %  
Placas de Petri con agar glucosado de Sabouraud  
Puntas de pipeta estériles  
Estufa de cultivos

**Método:**

Se prepara un banco de diluciones con los tubos de ensayo y la solución salina estéril para los tapones y otro banco para el líquido inoculante.

Se siembran posteriormente 0,1 mL. en placas de Petri de agar glucosado de Sabouraud, de cada tubo de ensayo de los bancos de diluciones y se disponen en la estufa de cultivo a 28°C durante 3 días.

Pasado este período de tiempo se procede la determinación cualitativa y cuantitativa de los hongos desarrollados en las placas.

### **3.2.18. Método para la realización de cromatografías en capa fina** **REF: MET 18**

#### **Objetivo:**

Determinar la presencia de metabolitos en los hongos filamentosos aislados de los diferentes tipos de tapones de corcho e inoculados en agar Czapeck.

#### **Material:**

Cromatofolios (Merck núm. 254®) de 15 cm de largo y 7 cm de ancho  
25 mL de fase líquida 50:50 (cloroformo: metanol)  
1 disco de 1 cm de diámetro de medio de cultivo Czapeck.  
1 disco de 1 cm de diámetro de medio de cultivo Czapeck + hongo desarrollado  
Cubetas de cromatografía  
Lápiz grafito  
Secador  
Lector de luz ultravioleta

#### **Método:**

Se disponen sobre los cromatofolios los discos obtenidos de las placas con agar Czapeck, separados entre sí 1 cm manteniéndose en contacto durante 5 minutos.

Se retiran los cultivos, se secan las manchas formadas y se introduce los cromatofolios en las cubetas previamente saturadas con 25 mL de la fase líquida.

Se mantienen los cromatofolios en la cubeta hasta que se aprecia el ascenso de la fase líquida hasta el 75% de su altura total.

Posteriormente se procede a retirar los cromatofolios que se secan con un secador.

Los cromatofolios se observan bajo la luz ultravioleta de longitud de onda: 365 nm., anotando los diversos componentes separados por la cromatografía.

**3.2.19. Método para determinar la presencia de metabolitos secundarios en los hongos aislados en los tapones de vino tranquilo y vino espumoso incubados durante 7, 14 y 21 días a través de cromatofolios.**

**REF: MET 19**

**Objetivo:**

Determinar la presencia de metabolitos secundarios en los hongos aislados de diferentes tipos de tapones de corcho.

**Material:**

Cromatofolios Merck® de 15 cm de largo y 7 cm de ancho  
25 mL. de fase líquida 50:50 (cloroformo : metanol)  
25 mL. de fase líquida 80:20 (cloroformo : metanol)  
1 disco de 6 mm de diámetro de medio de cultivo: agar Czapeck (control)  
1 disco de 6 mm de diámetro de medio de cultivo Czapeck inoculado con cada una de las cepas fúngicas en estudio  
Cubetas para cromatografía  
Lápiz grafito  
Secador  
Lector de luz ultravioleta

**Método:**

Se disponen sobre los cromatofolios los discos de cultivos y de control, separados entre sí 1 cm. Los discos se mantienen por espacio de cinco minutos, en contacto con el cromatofolio

Posteriormente, se eliminan los discos, se secan las manchas o depósitos y se introducen los cromatofolios en las cubetas de cromatografía que contienen 25 mL de la fase líquida.

Para cada muestra se utilizan dos fases móviles:

50:50 (cloroformo: metanol)

80:20 (cloroformo: metanol)

Se mantienen los cromatofolios en las cubetas de cromatografía hasta que la fase líquida alcanza hasta el 75% de su altura total.

Se sacan los cromatofolios de las cubetas de cromatografía y se secan con un secador.

Se leen bajo luz ultravioleta a una longitud de onda de 365 nm

### **3.2.20. Método de extracción de micotoxinas**

**REF: MET 20**

#### **Objetivo:**

Determinar la presencia de micotoxinas en los diferentes tipos de tapones inoculados con las diferentes especies de hongos filamentosos productores de micotoxinas

#### **Material:**

Cloroformo (CHCl<sub>3</sub>)

Tapones inoculados con hongos (naturales para vino tranquilo y para vino espumoso)

Erlenmeyers de 500 mL.

Agitador

Tubos de ensayo

#### **Método:**

Transcurridos siete, catorce y veintiún días después de la inoculación de los hongos a y los tapones se toma una muestra de un tapón de cada frasco estéril que contiene los tapones y se disponen en cada uno de los Erlenmeyers de 500 mL.

A los Erlenmeyers que contienen tapones de vino tranquilo, se le añaden 4 mL. de cloroformo mientras que a los que se le ha depositado tapones de vino espumoso, se le añaden 9 mL. de cloroformo. Los Erlenmeyers se disponen en agitador a 250 rpm por minuto durante 15 minutos, pasado este tiempo se filtra y se recupera el cloroformo en un tubo de ensayo, se tapa y se mantiene en refrigeración.

A partir del extracto clorofórmico obtenido se procede a la determinación de la posible presencia de micotoxinas.

**3.2.21. Método para determinar la producción de micotoxinas de los hongos inoculados en los tapones de vino y de vino espumoso durante 7, 14 y 21 días**  
**REF: MET 21**

**Objetivo:**

Determinar la actividad metabólica de los diferentes tipos de tapones de corcho inoculados con las diferentes especies de hongos productores de micotoxinas.

**Material:**

Cromatofolios (Merck<sup>®</sup>) de 15 cm de largo y 7 cm de ancho  
25 mL. de fase líquida 50:50 (cloroformo : metanol)  
25 mL. de fase líquida 80:20 (cloroformo : metanol)  
Tubos de ensayo que contienen el extracto clorofórmico obtenido a partir de la agitación de tapones de vino tranquilo y de vino espumoso  
Cubetas de cromatografía  
Lápiz grafito  
Secador  
Lector de luz ultravioleta

**Método:**

Se deposita sobre cada uno de los cromatofolios: 0.2µl de cada uno de los extractos clorofórmicos obtenidos.

Se introducen los cromatofolios en las cubetas de cromatografía que contienen 25 mL de la fase líquida.

Se ensayan las dos concentraciones siguientes:

50:50 (cloroformo: metanol)  
80:20 (cloroformo: metanol)

Los cromatofolios se mantienen en las cubetas de cromatografía hasta que la fase líquida ha alcanzado el 75% de su altura total.

Finalizada la cromatografía, se secan los cromatofolios mediante un secador.

Las placas se observan bajo luz ultravioleta de 365 nm. de longitud de onda



**3.2.22. Método para determinar la presencia de Ocratoxina A mediante sistema ELISA**  
**REF: MET 22**

**Objetivo:**

Cuantificar la presencia de Ocratoxina A, presente en los diferentes tipos de tapones de corcho.

**Material:**

Tapones de corcho (para vino tranquilo y para vino espumoso)  
Kits Veratox® para determinación de Ocratoxina A  
Disolución (50% metanol: 50% agua destilada)  
Erlenmeyers de 500 mL  
Agitador.  
Tubos de ensayo  
Lector ELISA

**Método:**

Se disponen tapones de vino tranquilo o de vino espumoso en los Erlenmeyers de 500mL.

A los tapones de vino tranquilo se añade 4mL de la dilución: Metanol: agua destilada (1:1) por tapón de y a los de vino espumoso se les añaden 9 mL/ tapón, de la mismo dilución.

Se procede a agitación de los Erlenmeyers preparados durante 15 minutos a 250 rpm. Transcurrido este período de tiempo se separa el extracto y se mantiene en tubos de ensayo.

Se realiza una segunda extracción en los Erlenmeyers y extracto obtenido se mezcla con obtenido anteriormente y mantiene en refrigeración hasta su evaluación.

A partir de estos tubos de ensayo se siguen las indicaciones del ensayo para determinar la posible presencia de Ocratoxina A, mediante un lector ELISA.

El procedimiento seguido, se resume a continuación:

- A cada uno de los viales marcados en rojo, se añaden 100  $\mu\text{L}$  de conjugado y se añaden 100  $\mu\text{L}$  de cada una de las concentraciones patrón de Ocratoxina A , a los cinco viales diferentes con el fin de que con el lector de ELISA se establezca la recta de calibración.
- A partir del sexto vial se van añadiendo 100  $\mu\text{L}$  de las diluciones de las muestras que se desean evaluar.
- Se mezcla.
- Se trasladan todas las muestras a nuevos viales y se deja incubar durante 10 minutos.
- Pasado este tiempo se lavan los viales 5 veces con agua desionizada y se secan los viales con papel secante.
- Cuando los viales están secos, se les transfieren 100  $\mu\text{L}$  de sustrato anticuerpo. Se incuba durante 10 minutos.
- Pasado este período de tiempo se transfieren 100  $\mu\text{L}$  del líquido para parar la reacción.
- Se trasladan los viales al lector ELISA y se leen los resultados a 650 nm



Lector ELISA

**3.2.23. Método para determinar la presencia de toxina T-2 mediante sistema  
ELISA  
REF: MET 23**

**Objetivo:**

Cuantificar la toxina T-2 presente en los diferentes tipos de tapones de corcho.

**Material:**

Tapones de corcho (para vino tranquilo y para vino espumoso)  
Kits Veratox® para determinación de T-2  
Disolución (50% metanol 50% agua destilada)  
Erlenmeyers de 500 mL.  
Agitador.  
Tubos de ensayo

**Método:**

Se disponen tapones de vino tranquilo o de vino espumoso en los Erlenmeyers de 500 mL.

A los tapones de vino tranquilo se añade 4mL de la dilución: Metanol: agua destilada (1:1) por tapón de vino tranquilo y a los de vino espumoso se les añaden 9 mL/ tapón, de la misma dilución.

Se procede a agitación de los Erlenmeyers preparados durante 15 minutos a 250 rpm. Transcurrido este período de tiempo se separa el extracto y se mantiene en tubos de ensayo.

Se realiza una segunda extracción en los Erlenmeyers y extracto obtenido se mezcla con obtenido anteriormente y mantiene en refrigeración hasta su evaluación.

A partir de estos tubos de ensayo se siguen las indicaciones del ensayo para determinar la posible presencia de Toxina T-2, mediante un lector ELISA.

El procedimiento utilizado, se resume a continuación:

- A cada uno de los viales marcados en rojo, se añaden 100  $\mu\text{L}$  de conjugado y se añaden 100  $\mu\text{L}$  de cada una de las concentraciones patrón de toxina T-2 a los cinco viales diferentes con el fin de que con el lector de ELISA se establezca la recta de calibración.
- A partir del 6 vial se van añadiendo 100  $\mu\text{L}$  de las diluciones de las muestras que se deseen evaluar.
- Se mezcla.
- Se trasladan todas las muestras a nuevos viales y se deja incubar durante 5 minutos.
- Pasado este tiempo se lavan los viales 5 veces con agua desionizada y se secan los viales con papel secante.
- Cuando los viales están secos, se les transfieren 100  $\mu\text{L}$  de substrato anticuerpo. Se incuba durante 10 minutos.
- Pasado este tiempo se transfieren 100  $\mu\text{L}$  del líquido para parar la reacción.
- Se trasladan los viales al lector de Elisa y se leen los resultados a 650 nm.

**3.2.24. Método para determinar la presencia de Aflatoxinas mediante sistema ELISA  
REF: MET 24**

**Objetivo:**

Cuantificar las aflatoxinas existentes en los diferentes tipos de tapones de corcho.

**Material:**

Tapones de corcho (para vino tranquilo y para vino espumoso)  
Kits Veratox® para determinación de AFLATOXINAS  
Disolución (70% metanol 30% agua destilada)  
Erlenmeyers de 500 mL.  
Agitador.  
Tubos de ensayo

**Método:**

Se disponen tapones de vino tranquilo o de vino espumoso en los Erlenmeyers de 500mL.

A los tapones de vino tranquilo se añade 4mL de la dilución: Metanol 70%: agua destilada 30% por tapón de y a los de vino espumoso se les añaden 9 mL/ tapón, de la mismo dilución.

Se procede a agitación de los Erlenmeyers preparados durante 15 minutos a 250 rpm. Transcurrido este período de tiempo se separa el extracto y se mantiene en tubos de ensayo.

Se realiza una segunda extracción en los Erlenmeyers y extracto obtenido se mezcla con obtenido anteriormente y mantiene en refrigeración hasta su evaluación.

A partir de estos tubos de ensayo se siguen las indicaciones del ensayo para determinar la posible presencia de Aflatoxinas, mediante un lector ELISA.

El resumen del procedimiento se aporta a continuación:

- A cada uno de los viales marcados en rojo, se añaden 100  $\mu\text{L}$  de conjugado y se añaden 100  $\mu\text{L}$  de cada una de las concentraciones patrón de Aflatoxina, a los cinco viales diferentes con el fin de que con el lector de ELISA se establezca la recta de calibración.
- A partir del sexto vial se van añadiendo 100  $\mu\text{L}$  de las diluciones de las muestras que se desean evaluar.
- Se mezcla.
- Se trasladan todas las muestras a nuevos viales y se deja incubar durante 10 minutos.
- Pasado este tiempo se lavan los viales 5 veces con agua desionizada y se secan los viales con papel secante.
- Cuando los viales están secos, se les transfieren 100  $\mu\text{L}$  de sustrato anticuerpo. Se incuba durante 10 minutos.
- Pasado este período de tiempo se transfieren 100  $\mu\text{L}$  del líquido para parar la reacción.
- Se trasladan los viales al lector ELISA y se leen los resultados a 650 nm.

**3.2.25. Método para determinar la presencia de Fumonisina mediante sistema ELISA**  
**REF: MET 25**

**Objetivo:**

Cuantificar la fumonisina existente en los diferentes tipos de tapones de corcho.

**Material:**

Tapones de corcho (para vino tranquilo y para vino espumoso)  
Kits Veratox® para determinación de Fumonisinias  
Disolución (70% metanol 30% agua destilada)  
Erlenmeyers de 500 mL.  
Agitador.  
Tubos de ensayo

**Método:**

Se disponen tapones de vino tranquilo o de vino espumoso en los Erlenmeyers de 500mL.

A los tapones de vino tranquilo se añade 4mL de la dilución: Metanol 70%: agua destilada 30% por tapón de y a los de vino espumoso se les añaden 9 mL/ tapón, de la mismo dilución.

Se procede a agitación de los Erlenmeyers preparados durante 15 minutos a 250 rpm. Transcurrido este período de tiempo se separa el extracto y se mantiene en tubos de ensayo.

Se realiza una segunda extracción en los Erlenmeyers y extracto obtenido se mezcla con obtenido anteriormente y mantiene en refrigeración hasta su evaluación.

A partir de estos tubos de ensayo se siguen las indicaciones del ensayo para determinar la posible presencia de Fumonisina, mediante un lector ELISA.

El resumen del procedimiento se aporta a continuación:

- A cada uno de los viales marcados en rojo, se añaden 100  $\mu\text{L}$  de conjugado y se añaden 100  $\mu\text{L}$  de cada una de las concentraciones patrón de Fumonisina, a los cinco viales diferentes con el fin de que con el lector de ELISA se establezca la recta de calibración.
- A partir del sexto vial se van añadiendo 100  $\mu\text{L}$  de las diluciones de las muestras que se desean evaluar.
- Se mezcla.
- Se trasladan todas las muestras a nuevos viales y se deja incubar durante 10 minutos.
- Pasado este tiempo se lavan los viales 5 veces con agua desionizada y se secan los viales con papel secante.
- Cuando los viales están secos, se les transfieren 100  $\mu\text{L}$  de substrato anticuerpo. Se incuba durante 10 minutos.
- Pasado este período de tiempo se transfieren 100  $\mu\text{L}$  del líquido para parar la reacción.
- Se trasladan los viales al lector ELISA y se leen los resultados a 650 nm.



**3.2.26. Método para determinar la presencia de Zearalenona mediante sistema ELISA**  
**REF: MET 26**

**Objetivo:**

Cuantificar la zearalenona existente en los diferentes tipos de tapones de corcho.

**Material:**

Tapones de corcho (para vino tranquilo y para vino espumoso)  
Kits Veratox® para determinación de Zearalenona  
Disolución (70% metanol 30% agua destilada)  
Erlenmeyers de 500 mL.  
Agitador.  
Tubos de ensayo

**Método:**

Se disponen tapones de vino tranquilo o de vino espumoso en los Erlenmeyers de 500mL.

A los tapones de vino tranquilo se añade 4mL de la dilución: Metanol 70%:agua destilada 30% por tapón de y a los de vino espumoso se les añaden 9 mL/ tapón, de la misma dilución.

Se procede a agitación de los Erlenmeyers preparados durante 15 minutos a 250 rpm . Transcurrido este período de tiempo se separa el extracto y se mantiene en tubos de ensayo.

Se realiza una segunda extracción en los Erlenmeyers y extracto obtenido se mezcla con obtenido anteriormente y mantiene en refrigeración hasta su evaluación.

A partir de estos tubos de ensayo se siguen las indicaciones del ensayo para determinar la posible presencia de Zearalenona, mediante un lector ELISA.

El resumen del procedimiento se aporta a continuación:

- A cada uno de los viales marcados en rojo, se añaden 100  $\mu\text{L}$  de conjugado y se añaden 100  $\mu\text{L}$  de cada una de las concentraciones patrón de Zearalenona, a los cinco viales diferentes con el fin de que con el lector de ELISA se establezca la recta de calibración.
- A partir del sexto vial se van añadiendo 100  $\mu\text{L}$  de las diluciones de las muestras que se desean evaluar.
- Se mezcla.
- Se trasladan todas las muestras a nuevos viales y se deja incubar durante 10 minutos.
- Pasado este tiempo se lavan los viales 5 veces con agua desionizada y se secan los viales con papel secante.
- Cuando los viales están secos, se les transfieren 100  $\mu\text{L}$  de substrato anticuerpo. Se incuba durante 10 minutos.
- Pasado este período de tiempo se transfieren 100  $\mu\text{L}$  del líquido para parar la reacción.
- Se trasladan los viales al lector ELISA y se leen los resultados a 650 nm.

**3.2.27. Método para determinar la presencia de toxina DON mediante sistema ELISA  
REF: MET 27**

**Objetivo:**

Cuantificar la micotoxina DON existente en los diferentes tipos de tapones de corcho.

**Material:**

Tapones de corcho (para vino tranquilo y para vino espumoso)  
Kits Veratox® para determinación de DON  
Disolución (100% agua destilada)  
Erlenmeyers de 500 mL.  
Agitador.  
Tubos de ensayo

**Método:**

Se disponen tapones de vino tranquilo o de vino espumoso en los Erlenmeyers de 500mL.

A los tapones de vino tranquilo se añade 4mL de agua destilada 100% por tapón de y a los de vino espumoso se les añaden 9 mL/ tapón, de la mismo dilución.

Se procede a agitación de los Erlenmeyers preparados durante 15 minutos a 250 rpm. Transcurrido este período de tiempo se separa el extracto y se mantiene en tubos de ensayo.

Se realiza una segunda extracción en los Erlenmeyers y extracto obtenido se mezcla con obtenido anteriormente y mantiene en refrigeración hasta su evaluación.

A partir de estos tubos de ensayo se siguen las indicaciones del ensayo para determinar la posible presencia de DON, mediante un lector ELISA.

El resumen del procedimiento se aporta a continuación:

- A cada uno de los viales marcados en rojo, se añaden 100  $\mu\text{L}$  de conjugado y se añaden 100  $\mu\text{L}$  de cada una de las concentraciones patrón de DON, a los cinco viales diferentes con el fin de que con el lector de ELISA se establezca la recta de calibración.
- A partir del sexto vial se van añadiendo 100  $\mu\text{L}$  de las diluciones de las muestras que se desean evaluar.
- Se mezcla.
- Se trasladan todas las muestras a nuevos viales y se deja incubar durante 10 minutos.
- Pasado este tiempo se lavan los viales 5 veces con agua desionizada y se secan los viales con papel secante.
- Cuando los viales están secos, se les transfieren 100  $\mu\text{L}$  de sustrato anticuerpo. Se incuba durante 10 minutos.
- Pasado este período de tiempo se transfieren 100  $\mu\text{L}$  del líquido para parar la reacción.
- Se trasladan los viales al lector ELISA y se leen los resultados a 650 nm.

### **3.2.28. Método para la inoculación en tapones de corcho de micotoxinas y evaluación de la migración de las mismas.**

**Ref: MET 28**

#### **Objetivo:**

Preparar tapones con concentraciones conocidas de micotoxinas y cuantificar la migración de las mismas a vino tranquilo y de vino espumoso.

#### **Material:**

Tapones de corcho (25 para vino tranquilo y 25 para vino espumoso)  
Microjeringas de 5 µL (Hamilton ®)  
50 botellas de vino con *gollete* normalizado de 37,5 mL de capacidad útil  
Kits Veratox® para determinación de Ocratoxina A  
Kits Veratox® para determinación de Aflatoxina  
Kits Veratox® para determinación de Fumonisina  
Kits Veratox® para determinación de DON  
Kits Veratox® para determinación de T-2  
Agua destilada  
Disolución (50% metanol: 50% agua destilada)  
Disolución (70% metanol: 30% agua destilada)  
Erlenmeyers de 500 mL.  
Agitador.  
Tubos de ensayo  
Cámara climática  
Máquina para encorchar tapones de vino tranquilo  
Máquina para encorchar tapones de vino espumoso.  
Máquina para descorchar tapones de vino.  
Máquina para descorchar tapones de vino espumoso

#### **Método:**

Se separan los 25 tapones de cada tipo en cinco lotes con cinco tapones cada uno y cada lote se inocula con cada una de las siguientes micotoxinas:

<b>Ocratoxina A</b>
<b>Deoxinivalenol</b>
<b>Fumonisina</b>
<b>Aflatoxina</b>
<b>T-2</b>

A cada tapón de vino tranquilo, se le inoculan 50 µL (5x10 µL) de las micotoxinas, 3x10 µL en cada cara del tapón y 4x10 µL en el lateral del tapón.

En el caso de los tapones para vino espumoso, se aplican 5x10 µL de las micotoxinas en la zona de la arandela del tapón.

La concentración aplicada de cada micotoxinas es:

<b>Micotoxinas</b>	<b>Concentración aplicada en cada inoculación con la microjeringa</b>
<b>Ocratoxina A</b>	<b>25 ppb</b>
<b>Deoxinivalenol</b>	<b>3 ppm</b>
<b>Fumonisina</b>	<b>6 ppm</b>
<b>Aflatoxina</b>	<b>8 ppb</b>
<b>T-2</b>	<b>250 ppb</b>

Preparados los lotes de los tapones con las diversas micotoxinas en estudio, se disponen 100 mL de vino blanco en botellas nuevas que no han estado en contacto con tapones de corcho.

En total se preparan cincuenta botellas que poseen una capacidad útil de 37,5 cL de capacidad. Se tapan con los corchos previamente inoculados con las diferentes micotoxinas según lotes de análisis y se disponen en posición invertida, con el fin de que están en contacto directo los tapones con el vino a lo largo de 10 días a 40°C en una cámara climática.

Pasado este tiempo se descorchan las botellas y se realizan las extracciones de las micotoxinas de los tapones, siguiendo los diversos métodos descritos para cada una de las micotoxinas: Mét. 22 para Ocratoxina A, Mét. 23 para T-2, Mét. 24 para Aflatoxina, Mét. 25 para Fumonisina y Mét. 27 para Deoxnivalenol.

Con el fin de detectar la posible presencia de micotoxinas en el vino como consecuencia de la migración de las mismas, se procede a mezclar 1 mL de vino con 1mL del extractante de cada micotoxina y se agitan durante media hora.

Transcurrido este período de tiempo se siguen las indicaciones necesarias para poder cuantificar la posible presencia de cada micotoxina, siguiendo la metodología descrita en cada caso y aplicando el lector ELISA para la cuantificación.

## RESULTADOS

---

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS Y LEVADURAS A PARTIR DE TAPONES DE CORCHO**

Las Tablas números 5 a 7, resumen la relación de especies de hongos filamentosos y levaduras aisladas de los diversos tipos de tapones de corcho investigados.

Tabla núm. 5.- Especies de hongos filamentosos aisladas de tapones de corcho natural para vino tranquilo.

---

<i>Monilia sitophila</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Trichoderma viride</i>
<i>Mucor hiemalis</i>	<i>Penicillium frequentans</i>	<i>Cladosporium herbarum</i>
<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>

---

Tabla núm. 6.- Especies de hongos filamentosos y levaduras aisladas de tapones de corcho natural para vino espumoso.

---

<i>Monilia sitophila</i>	<i>Penicillium frequentans</i>	<i>Penicillium citrinum</i>
<i>Rhizopus arrhizus</i>	<i>Trichoderma viride</i>	<i>Cladosporium herbarum</i>
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Mucor hiemalis</i>
<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>

---

Tabla núm. 7.- Especies de hongos filamentosos aislados de tapones aglomerados para vino.

---

<i>Trichoderma viride</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Alternaria alternata</i>
<i>Penicillium frequentans</i>	<i>Monilia sitophila</i>	<i>Cladosporium herbarum</i>

---



En la Tabla núm. 8 se aportan los porcentajes de aislamiento de cada una de las especies de hongos identificadas en cada uno de los tipos de tapones de corcho investigados.

Tabla núm. 8.- Porcentaje de aislamiento de las cepas de hongos aisladas en los diferentes tipos de tapones de corcho.

<b>CEPAS FÚNGICAS</b>	<b>Tapones para vino tranquilo</b>	<b>Tapones para vino espumoso</b>	<b>Tapones aglomerados</b>
<i>Monilia sitophila</i>	75%	100 %	100 %
<i>Penicillium frequentans</i>	100 %	83,33 %	100 %
<i>Penicillium citrinum</i>	50 %	66,67 %	50 %
<i>Trichoderma viride</i>	100 %	66,67 %	100 %
<i>Cladosporium herbarum</i>	50 %	33,33 %	100 %
<i>Aspergillus flavus</i>	0 %	33,33 %	50 %
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0 %	16,67 %	0 %
<i>Alternaria alternata</i>	75 %	33,33 %	100 %
<i>Aureobasidium pullulans</i>	25 %	16,67 %	0 %
<i>Fusarium moniliforme</i>	25 %	0 %	50 %
<i>Rhizopus arrhizus</i>	0 %	50 %	50 %
<i>Mucor hiemalis</i>	50 %	16,67 %	50 %
<i>Rhodotorula glutinis</i>	0 %	16,67 %	50 %

#### 4.2. RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LAS CEPAS AISLADAS DE TAPONES DE CORCHO

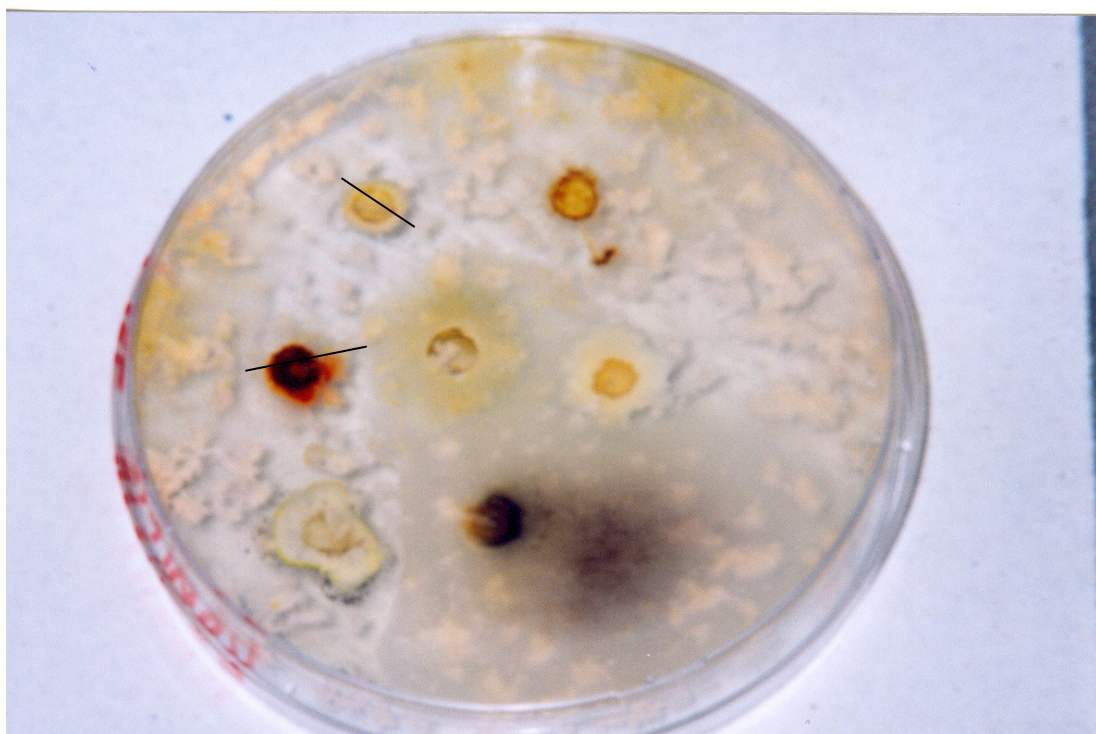
En la tabla núm. 9 se resume la capacidad inhibidora de las cepas fúngicas aisladas a partir de los diversos tapones de corcho investigados.

Para una mejor interpretación de la Tabla debe indicarse que se enfrentaron todas las cepas fúngicas entre sí. En ordenadas, se aportan los cultivos en los que se ensayó la actividad la inhibidora y en él de abcisas, la cepa a la que se enfrentaba cada cultivo.

Tabla núm. 9.- Resultados de la actividad inhibidora de las cepas fúngicas aisladas de los tapones de corcho investigados.

	CEPAS FÚNGICAS FRENTE A LAS QUE SE ENSAYÓ LA ACTIVIDAD INHIBIDORA							
DISCOS DE CULTIVOS	<i>A. Níger</i>	<i>A. flavus</i>	<i>P. citrinum</i>	<i>P. frequentans</i>	<i>P. purpurescens</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>F. moniliforme</i>	<i>M. sitophila</i>
<i>Aspergillus niger</i>	NO INH.	INH.	INH.	INH.	INH.	INH.	INH.	INH.
<i>Aspergillus flavus</i>	INH.	NO INH.	INH.	INH.	INH.	INH.	INH.	INH.
<i>Penicillium citrinum</i>	INH.	INH.	NO INH.	INH.	INH.	INH.	INH.	INH.
<i>Penicillium frequentans</i>	INH.	INH.	INH.	NO INH.	INH.	INH.	INH.	INH.
<i>Penicillium purpurescens</i>	INH.	INH.	INH.	INH.	NO INH.	INH.	INH.	INH.
<i>Aspergillus ochraceus</i>	INH.	INH.	INH.	INH.	INH.	NO INH.	INH.	INH.
<i>Fusarium moniliforme</i>	INH.	INH.	INH.	INH.	INH.	INH.	NO INH.	INH.
<i>Monilia sitophila</i>	NO INH.	NO INH.	NO INH.	NO INH.	NO INH.	NO INH.	NO INH.	NO INH.

INH. : Inhibición de la cepa.      NO INH.: No Inhibición.



**Actividad inhibidora de las cepas fúngicas ensayadas frente a *Monilia sitophila*. La línea señala la zona de inhibición observada *in vitro*.**

### **4.3. RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS HONGOS FILAMENTOSOS INVESTIGADOS**

En la Tabla núm. 10, se aportan los resultados correspondientes a las actividades enzimáticas detectadas por el método API ZYM en las ocho cepas de hongos filamentosos investigadas.

En la Tabla sólo se relacionan las actividades enzimáticas detectadas como mínimo en una de las cepas investigadas.

Ninguna de las cepas estudiadas presentó las siguientes actividades: tripsina, quimotripsina,  $\alpha$ -manosidasa ni  $\alpha$ -fucosidasa.

Para una mejor interpretación de la Tabla debe tenerse en cuenta que la detección es semicuantitativa y los números corresponden a:

<p><b>0 = reacción negativa</b> <b>0,5 = 2,5 nanomoles</b> <b>1 = 5 nanomoles</b> <b>2 = 10 nanomoles</b> <b>3 = 20 nanomoles</b> <b>4 = 30 nanomoles</b> <b>5 &gt; 30 nanomoles</b></p>
--

Tabla núm.10.- Presencia semicuantitativa de diversos enzimas, detectados por el método API ZYM®.

ENZIMA INVESTIGADO	<i>Monilia sitophila</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Penicillium frequentans</i>	<i>Penicillium purpurescens</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>
Fosfatasa alcalina	5	1	4	0	1	1	5	1
Esterasa C1	2	1	2	1	1	2	3	3
Esterasa lipasa C8	2	1	2	0	1	3	3	2
Lipasa C14	0	0	0	0	0	0,5	0	0
Leucina arilamidasa	4	1	2	1	0,5	2	0,5	1
Valina arilamidasa	1	1	0	0	0,5	0,5	0,5	0
Cistina arilamidasa	0	1	0	0	0	0	0,5	0
Fosfatasa ácida	5	2	3	1	5	4	5	5
Naftol-A-S-BI-fosfohidrolasa	5	2	2	1	5	1	3	5
$\alpha$ - galactosidasa	0	0	1	0	5	2	4	0
$\beta$ -galactosidasa	1	1	1	0	1	1	1	0
$\beta$ -glucuronidasa	1	0	0	0	1	0	0	0
$\alpha$ – glucosidasa	1	0	1	0	5	1	5	0
$\beta$ – glucosidasa	5	3	3	1	4	5	5	1
N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasa	0	3	4	2	5	5	5	0



Ensayo de API ZYM® con una de las cepas fúngicas objeto e estudio.

#### 4. 4.- RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA REALIZACION DE LAS CROMATOGRAFIAS EN CAPA FINA

Los resultados de las cromatografías en capa fina a partir de discos de cultivo de las diversas cepas aisladas de tapones de corcho se resumen en las Tablas núms. 11 a 17.

En ella se indica la detección de metabolitos secundarios en las cepas ensayadas según los líquidos de desarrollo utilizados. Se compararon los Rf detectados con los controles positivos de las diversas micotoxinas analizadas

Los ensayos se realizaron con cultivos de 7, 14 y 21 días en Agar Czapeck

Tabla núm. 11.- Resultados correspondientes a las cromatografías en capa fina realizadas a partir de cultivos de *Aspergillus niger*

Días de incubación de la cepa	Líquido de desarrollo Cloroformo:metanol (1:1)	Líquido de desarrollo Cloroformo:metanol (4:1)
7 días	ND	Ocratoxina A
14 días	ND	Ocratoxina A
21 días	ND	Ocratoxina A

ND: No detectado

Tabla núm.12.- Resultados correspondientes a las cromatografías en capa fina realizadas a partir de cultivos de *Fusarium moniliforme*

Días de Incubación de la cepa	Líquido de desarrollo Cloroformo:metanol (1:1)	Líquido de desarrollo Cloroformo:metanol (4:1)	Líquido de desarrollo Cloroformo: Acetato de etilo:Acido acético (6:3:1)
7 días	ND	ND	Zearalenona
14 días	ND	ND	Zearalenona
21 días	ND	ND	Zearalenona

ND: No detectado

Tabla núm. 13.- Resultados correspondientes a las cromatografías en capa fina realizadas a partir de cultivos de *Aspergillus ochraceus*

<b>Días de incubación de la cepa</b>	<b>Líquido de desarrollo Cloroformo:metanol (1:1)</b>	<b>Líquido de desarrollo Cloroformo:metanol (4:1)</b>
<b>7 días</b>	<b>Ocratoxina A</b>	<b>Ocratoxina A</b>
<b>14 días</b>	<b>Ocratoxina A</b>	<b>Ocratoxina A</b>
<b>21 días</b>	<b>Ocratoxina A</b>	<b>Ocratoxina A</b>

ND: No detectado

Tabla núm. 14.- Resultados correspondientes a las cromatografías en capa fina realizadas a partir de cultivos de *Aspergillus flavus*

<b>Días de incubación de la cepa</b>	<b>Líquido de desarrollo Cloroformo:metanol (1:1)</b>	<b>Líquido de desarrollo Cloroformo:metanol (4:1)</b>
<b>7 días</b>	<b>Aflatoxinas</b>	<b>Aflatoxinas</b>
<b>14 días</b>	<b>Aflatoxinas</b>	<b>Aflatoxinas</b>
<b>21 días</b>	<b>Aflatoxinas</b>	<b>Aflatoxinas</b>

ND: No detectado

Tabla núm. 15.- Resultados correspondientes a las cromatografías en capa fina realizadas a partir de cultivos de *Penicillium citrinum*

<b>Días de incubación de la cepa</b>	<b>Líquido de desarrollo Cloroformo:metanol (1:1)</b>	<b>Líquido de desarrollo Cloroformo:metanol (4:1)</b>
<b>7 días</b>	<b>Aflatoxinas</b>	<b>Aflatoxinas</b>
<b>14 días</b>	<b>Aflatoxinas</b>	<b>Aflatoxinas</b>
<b>21 días</b>	<b>Aflatoxinas</b>	<b>Aflatoxinas</b>

ND: No detectado



Tabla núm. 16.- Resultados correspondientes a las cromatografías en capa fina realizadas a partir de cultivos de *Penicillium frequentans*

<b>Días de incubación de la cepa</b>	<b>Líquido de desarrollo Cloroformo:metanol (1:1)</b>	<b>Líquido de desarrollo Cloroformo:metanol (4:1)</b>
<b>7 días</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>
<b>14 días</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>
<b>21 días</b>	<b>Aflatoxinas</b>	<b>Aflatoxinas</b>

ND: No detectado

Tabla núm. 17.- Resultados correspondientes a las cromatografías en capa fina realizadas a partir de cultivos de *Penicillium purpurescens*

<b>Días de incubación de la cepa</b>	<b>Líquido de desarrollo Cloroformo:metanol (1:1)</b>	<b>Líquido de desarrollo Cloroformo:metanol (4:1)</b>
<b>7 días</b>	<b>Aflatoxinas</b>	<b>ND</b>
<b>14 días</b>	<b>Aflatoxinas</b>	<b>ND</b>
<b>21 días</b>	<b>Aflatoxinas</b>	<b>ND</b>

ND: No detectado

#### **4.5.- RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS DETERMINACIONES DE pH DE LOS DIVERSOS TAPONES INVESTIGADOS**

En la Tabla núm.18 se indican los valores relativos al pH de los tapones analizados tras sumergirlos en agua destilada por espacio de siete días.

Los valores indicados corresponden a los obtenidos tras realizar el ensayo con veinticinco tapones de cada uno de los grupos en estudio

Tabla núm. 18.- Valores de pH de los distintos tapones sumergidos en agua destilada en relación con el control.

<b>TAPONES</b>	<b>pH</b>
<b>Tapones control</b>	<b>7.0 ± 0.1</b>
<b>Tapón natural de vino tranquilo</b>	<b>5.0 ± 0.1</b>
<b>Tapón de vino espumoso</b>	<b>6.5 ± 0.1</b>
<b>Tapón aglomerado</b>	<b>6.0 ± 0.1</b>

#### 4.6. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL PROCESO DE ESTERILIZACIÓN DE TAPONES

Tras el proceso de esterilización de lotes de tapones para vino tranquilo y para vino espumoso, siguiendo el método descrito en el apartado 3.2.8., se ha procedido a evaluar los posibles cambios físicos que hayan podido experimentar, así como a ratificar la no presencia de colonias viables en los mismos.

Los resultados obtenidos se aportan en la Tabla núm. 19.

Tabla núm. 19.- Cuadro resumen de los análisis físicos y microbiológicos realizados a los diferentes tipos de tapones, tras su esterilización en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

<b>CARACTERÍSTICA EVALUADA</b>	<b>Tapones para vino tranquilo</b>	<b>Tapones para vino espumoso</b>	<b>Tapones aglomerados</b>	<b>Valores de control</b>
<b>Diámetro</b>	<b>0,8 mm.</b>	*	*	<b>+ 0,5 mm.</b>
<b>Longitud</b>	<b>Ligeramente inclinados</b>	<b>Ligeramente inclinados</b>	<b>Ligeramente inclinados</b>	<b>No hay normativa al respecto</b>
<b>Aspecto físico</b>	<b>Deformado</b>	<b>Rugosos, arandelas no desunidas</b>	<b>Deformados</b>	<b>No hay normativa al respecto</b>
<b>Humedad</b>	<b>11 %</b>	<b>11 %</b>	<b>11 %</b>	<b>5- 8 %</b>
<b>Microbiología</b>	<b>0 UFC</b>	<b>0 UFC</b>	<b>0 UFC</b>	<b>&lt; 10 UFC/tapón para hongos</b>
<b>Densidad</b>	<b>230 kg/m<sup>3</sup> (a)</b>	*	<b>320 kg/m<sup>3</sup> (b)</b>	<b>(a) 135- 220 kg/m<sup>3</sup> (b) 260-320 kg/m<sup>3</sup></b>
<b>Fuerza de extracción</b>	<b>45 daN</b>	*	<b>47 daN</b>	<b>15- 40 daN</b>
<b>Tensión rotura</b>	*	<b>5 DaN/cm<sup>2</sup></b>	*	<b>&gt; 7,5 DaN/cm<sup>2</sup></b>

\* Indica que no se realiza este tipo de ensayo para estos tapones

Para la densidad los valores de referencia son diferentes si son tapones para vino tranquilo o tapones aglomerados.

#### 4.7.- RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA INOCULACIÓN EXPERIMENTAL DE CEPAS FÚNGICAS EN LOS TAPONES DE CORCHO

Los resultados correspondientes a la capacidad de recuperación de cepas inoculadas a tapones para vino tranquilo y para vino espumoso previamente esterilizados se indican a continuación.

Cada uno de los lotes de tapones previamente esterilizados, se inocularon con las cepas siguientes:

*Aspergillus flavus*                      *Aspergillus niger*                      *Aspergillus ochraceus*  
*Fusarium moniliforme*              *Penicillium citrinum*                  *Penicillium frequentans*  
*Penicillium purpurescens*

La concentración inicial de la suspensión fúngica inoculada dependiendo de cada cepa fue la siguiente:

<i>Aspergillus flavus</i>	$2 \times 10^{10}$ UFC/mL
<i>Aspergillus niger</i>	$4 \times 10^{11}$ UFC/mL
<i>Aspergillus ochraceus</i>	$2 \times 10^5$ UFC/mL
<i>Fusarium moniliforme</i>	$3 \times 10^6$ UFC/mL
<i>Penicillium citrinum</i>	$1 \times 10^7$ UFC/mL
<i>Penicillium frequentans</i>	$3 \times 10^7$ UFC/mL
<i>Penicillium purpurescens</i>	$3 \times 10^9$ UFC/mL

En las Tablas núms. 20 a 26 se resumen los recuentos obtenidos para cada cepa fúngica en los diversos sustratos analizados.

Tabla núm. 20.- Resultados correspondientes a la inoculación de *Aspergillus flavus* a diversos taponos de vino espumoso y de vino tranquilo.

	<b>Recuentos de <i>Aspergillus flavus</i></b>
<b>Concentración de la suspensión inoculada</b>	<b><math>2 \times 10^{10}</math> UFC/mL</b>
<b>Tapones de vino espumoso tiempo cero</b>	<b><math>2 \times 10^5</math> UFC</b>
Tapones de vino espumoso 14 días	$4 \times 10^5$ UFC
Tapones de vino espumoso 21 días	$2 \times 10^6$ UFC
<b>Tapones de vino tranquilo tiempo cero</b>	<b><math>3 \times 10^7</math> UFC</b>
Tapones de vino tranquilo 14 días	$2 \times 10^7$ UFC
Tapones de vino tranquilo 21 días	$2 \times 10^4$ UFC

Tabla núm. 21.- Resultados correspondientes a la inoculación de *Aspergillus niger* a diversos taponos de vino espumoso y de vino tranquilo.

	<b>Recuentos de <i>Aspergillus niger</i></b>
<b>Concentración de la suspensión inoculada</b>	<b><math>4 \times 10^{11}</math> UFC/mL</b>
<b>Tapones de vino espumoso tiempo cero</b>	<b><math>1 \times 10^5</math> UFC</b>
Tapones de vino espumoso 14 días	$2 \times 10^{10}$ UFC
Tapones de vino espumoso 21 días	$3 \times 10^{10}$ UFC
<b>Tapones de vino tranquilo tiempo cero</b>	<b><math>3 \times 10^2</math> UFC</b>
Tapones de vino tranquilo 14 días	$2 \times 10^{10}$ UFC
Tapones de vino tranquilo 21 días	$2 \times 10^{10}$ UFC

Tabla núm. 22.- Resultados correspondientes a la inoculación de *Aspergillus ochraceus* a diversos tapones de vino espumoso y de vino tranquilo.

	<b>Recuentos de <i>Aspergillus ochraceus</i></b>
<b>Concentración de la suspensión inoculada</b>	<b>2 x 10<sup>5</sup> UFC/mL</b>
<b>Tapones de vino espumoso tiempo cero</b>	<b>3 x 10<sup>2</sup> UFC</b>
Tapones de vino espumoso 14 días	2 x 10 <sup>3</sup> UFC
Tapones de vino espumoso 21 días	3 x 10 <sup>6</sup> UFC
<b>Tapones de vino tranquilo tiempo cero</b>	<b>4 x 10<sup>2</sup> UFC</b>
Tapones de vino tranquilo 14 días	4 x 10 <sup>3</sup> UFC
Tapones de vino tranquilo 21 días	3 x 10 <sup>5</sup> UFC

Tabla núm. 23.- Resultados correspondientes a la inoculación de *Fusarium moniliforme* a diversos tapones de vino espumoso y de vino tranquilo.

	<b>Recuentos de <i>Fusarium moniliforme</i></b>
<b>Concentración de la suspensión inoculada</b>	<b>3 x 10<sup>6</sup> UFC/mL</b>
<b>Tapones de vino espumoso tiempo cero</b>	<b>2 x 10<sup>3</sup> UFC</b>
Tapones de vino espumoso 14 días	7 x 10 <sup>6</sup> UFC
Tapones de vino espumoso 21 días	2 x 10 <sup>7</sup> UFC
<b>Tapones de vino tranquilo tiempo cero</b>	<b>9 x 10<sup>2</sup> UFC</b>
Tapones de vino tranquilo 14 días	1 x 10 <sup>7</sup> UFC
Tapones de vino tranquilo 21 días	1 x 10 <sup>6</sup> UFC

Tabla núm. 24.- Resultados correspondientes a la inoculación de *Penicillium citrinum* a diversos tapones de vino espumoso y de vino tranquilo.

	<b>Recuentos de <i>Penicillium citrinum</i></b>
<b>Concentración de la suspensión inoculada</b>	<b>1 x 10<sup>7</sup> UFC/mL</b>
<b>Tapones de vino espumoso tiempo cero</b>	<b>3 x 10<sup>3</sup> UFC</b>
Tapones de vino espumoso 14 días	5 x 10 <sup>6</sup> UFC
Tapones de vino espumoso 21 días	1 x 10 <sup>10</sup> UFC
<b>Tapones de vino tranquilo tiempo cero</b>	<b>6 x 10<sup>3</sup> UFC</b>
Tapones de vino tranquilo 14 días	1 x 10 <sup>6</sup> UFC
Tapones de vino tranquilo 21 días	3 x 10 <sup>10</sup> UFC

Tabla núm.25.- Resultados correspondientes a la inoculación de *Penicillium frequentans* a diversos tapones de vino espumoso y de vino tranquilo.

	<b>Recuentos de <i>Penicillium frequentans</i></b>
<b>Concentración de la suspensión inoculada</b>	<b>3 x 10<sup>7</sup> UFC/mL</b>
<b>Tapones de vino espumoso tiempo cero</b>	<b>3 x 10<sup>3</sup> UFC</b>
Tapones de vino espumoso 14 días	2 x 10 <sup>7</sup> UFC
Tapones de vino espumoso 21 días	5 x 10 <sup>10</sup> UFC
<b>Tapones de vino tranquilo tiempo cero</b>	<b>1 x 10<sup>3</sup> UFC</b>
Tapones de vino tranquilo 14 días	7 x 10 <sup>6</sup> UFC
Tapones de vino tranquilo 21 días	4 x 10 <sup>9</sup> UFC

Tabla núm. 26.- Resultados correspondientes a la inoculación de *Penicillium purpureescens* a diversos tapones de vino espumoso y de vino tranquilo.

	Recuentos de <i>Penicillium purpureescens</i>
<b>Concentración de la suspensión inoculada</b>	<b>3 x 10<sup>9</sup> UFC/mL</b>
<b>Tapones de vino espumoso tiempo cero</b>	<b>4 x 10<sup>4</sup> UFC</b>
Tapones de vino espumoso 14 días	2 x 10 <sup>10</sup> UFC
Tapones de vino espumoso 21 días	6 x 10 <sup>10</sup> UFC
<b>Tapones de vino tranquilo tiempo cero</b>	<b>3 x 10<sup>3</sup> UFC</b>
Tapones de vino tranquilo 14 días	2 x 10 <sup>10</sup> UFC
Tapones de vino tranquilo 21 días	3 x 10 <sup>10</sup> UFC

#### 4. 8.- RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA RECUPERACIÓN DE LA MEZCLA DE CEPAS FÚNGICAS EXPERIMENTALMENTE INOCULADAS

Tras la inoculación experimental de una mezcla de cepas fúngicas a tapones de corcho que se utilizaron para el envasado de vino tranquilo y espumoso se procedió al análisis microbiológico de los tapones y de los vinos en contacto con ellos.

Como se indica en el apartado correspondiente las cepas inoculadas fueron:

<i>Monilia sitophila</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium frequentans</i>	<i>Penicillium citrinum</i>
<i>Penicillium purpureescens</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>	

Las placas se incubaron por espacio de 3-5 días a 28°C

La concentración de cada cepa fue del orden de: 2-5x10 <sup>3</sup> UFC/mL
La inoculación de las cepas se realizó en la proporción: 1:1:1:1:1:1:1.



Los resultados medios obtenidos en la realización del ensayo fueron:

<p><b>UFC/g en tapones para vino tranquilo: <math>9 \pm 1</math></b>  <b>UFC/mL de vino tranquilo en contacto con los tapones inoculados: <math>50 \pm 1</math></b></p> <p><b>UFC/g en tapones para vino espumoso: <math>11 \pm 1</math></b>  <b>UFC/mL de vino espumoso en contacto con los tapones inoculados: <math>48 \pm 1</math></b></p>
--

A partir de los cultivos desarrollados se identificaron en cada uno de los sustratos analizados las especies que se resumen en la Tabla núm. 27.

Tabla núm.27.- Relación de cepas fúngicas recuperadas de cada uno de los sustratos. .

	<b>CEPAS IDENTIFICADAS</b>
<b>Tapones para vino tranquilo</b>	<i>Monilia sitophila, Aspergillus flavus, Fusarium moniliforme.</i>
<b>Vino tranquilo</b>	<i>Monilia sitophila, Aspergillus niger, Aspergillus flavus, Aspergillus ochraceus, Penicillium frequentans, Fusarium moniliforme.</i>
<b>Tapones para vino espumoso</b>	<i>Monilia sitophila, Aspergillus flavus, Aspergillus ochraceus, Aureobasidium pullulans.</i>
<b>Vino espumoso</b>	<i>Monilia sitophila, Aspergillus flavus, Aspergillus ochraceus, Penicillium frequentans, Aureobasidium pullulans.</i>

#### **4.9. RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE LA DETECCIÓN DE MICOTOXINAS EN LOS TAPONES INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE CON CEPAS PRODUCTORAS.**

A continuación se resumen los resultados obtenidos en el estudio de la detección de micotoxinas en los tapones para vino tranquilo y para vino espumoso, inoculados experimentalmente con cepas previamente aisladas de tapones de corcho y demostradas como productoras de micotoxinas (apartado 4. 4).

La detección de las micotoxinas fue realizada por medio de cromatografías en capa fina, según metodología descrita en los apartados y corroborada por técnica ELISA, con patrones específicos para cada micotoxina y descrita en los apartados

Debe indicarse que en todas las muestras en las que se detectó la probable presencia de micotoxinas por cromatografía en capa fina, ésta fue corroborada por la técnica ELISA y en consecuencia se procedió a cuantificar la producción de las micotoxinas detectadas.

En ningún caso, se observó que cepas en las que no se detectó la presuntiva producción de micotoxinas por cromatografía en capa fina, fueran positivas al ser evaluadas por la técnica ELISA o viceversa.

#### 4.9.1. Resultados obtenidos en el estudio de la detección de Aflatoxinas en los tapones inoculados experimentalmente con *Aspergillus flavus*.

En las Tablas núms. 28 y 29, se resumen los resultados obtenidos en el estudio de la detección de aflatoxinas en los tapones de corcho inoculados experimentalmente con una cepa de *Aspergillus flavus*.

Los resultados obtenidos, se expresan en ppb de aflatoxinas recuperadas tras 7, 14 ó 21 días de contacto de los tapones para vino tranquilo (entero o triturado) con la cepa fúngica, indicando asimismo, el número de agitaciones a que fueron sometidos.

Tabla núm. 28.- Resultados obtenidos en el estudio de la detección de aflatoxinas en los tapones de corcho para vino tranquilo inoculados experimentalmente con *Aspergillus flavus*.

<b>Tipo de tapón ensayado</b>	<b>Tiempo de contacto hongo/tapón</b>	<b>Número de agitaciones</b>	<b>Aflatoxinas (ppb)</b>
Tapón para vino tranquilo (entero)	7 días	1	0.0
Tapón para vino tranquilo (entero)	7 días	2	0.2
Tapón para vino tranquilo (triturado)	7 días	1	1.2
Tapón para vino tranquilo (triturado)	7 días	2	1.2
Tapón para vino tranquilo (entero)	14 días	1	0.2
Tapón para vino tranquilo (entero)	14 días	2	0.0
Tapón para vino tranquilo (triturado)	14 días	1	0.4
Tapón para vino tranquilo (triturado)	14 días	2	1.0
Tapón para vino tranquilo (entero)	21 días	1	0.0
Tapón para vino tranquilo (entero)	21 días	2	0.0
Tapón para vino tranquilo (triturado)	21 días	1	0.0
Tapón para vino tranquilo (triturado)	21 días	2	0.0

En la Tabla núm. 29, se aportan los resultados obtenidos, expresados en ppb de aflatoxinas recuperadas tras 7, 14 ó 21 días de contacto de los tapones para vino espumoso (entero o triturado) con la cepa fúngica, indicando, asimismo, el número de agitaciones a que fueron sometidos.

**Tabla núm. 29.-** Resultados obtenidos en el estudio de la detección de aflatoxinas en los tapones de corcho para vino espumoso inoculados experimentalmente con *Aspergillus flavus*.

<b>Tipo de tapón ensayado</b>	<b>Tiempo de contacto hongo/tapón</b>	<b>Número de agitaciones</b>	<b>Aflatoxinas (ppb)</b>
Tapón para vino espumoso (entero)	7 días	1	0.0
Tapón para vino espumoso(entero)	7 días	2	0.0
Tapón para vino espumoso(triturado)	7 días	1	0.0
Tapón para vino espumoso(triturado)	7 días	2	0.0
Tapón para vino espumoso (entero)	14 días	1	0.0
Tapón para vino espumoso(entero)	14 días	2	0.3
Tapón para vino espumoso(triturado)	14 días	1	0.0
Tapón para vino espumoso(triturado)	14 días	2	0.0
Tapón para vino espumoso (entero)	21 días	1	0.2
Tapón para vino espumoso(entero)	21 días	2	0.0
Tapón para vino espumoso (triturado)	21 días	1	0.0
Tapón para vino espumoso(triturado)	21 días	2	0.0

#### 4.9.2. Resultados obtenidos en el estudio de la detección de Aflatoxinas en los tapones inoculados experimentalmente con *Penicillium citrinum*.

En las Tablas núms. 30 y 31 se resumen los resultados obtenidos en el estudio de la detección de aflatoxinas en los tapones de corcho inoculados experimentalmente con una cepa de *Penicillium citrinum*.

En la Tabla 30, se aportan los resultados obtenidos, expresados en ppb de aflatoxinas recuperadas tras 10, 14 ó 21 días de contacto de los tapones para vino tranquilo (entero o triturado) con la cepa fúngica, indicando, asimismo, el número de agitaciones a que fueron sometidos.

Tabla núm. 30.- Resultados obtenidos en el estudio de la detección de aflatoxinas en los tapones de corcho para vino tranquilo inoculados experimentalmente con *Penicillium citrinum*.

<b>Tipo de tapón ensayado</b>	<b>Tiempo de contacto hongo/tapón</b>	<b>Número de agitaciones</b>	<b>Aflatoxinas (ppb)</b>
Tapón para vino tranquilo (entero)	10 días	1	2.6
Tapón para vino tranquilo (entero)	10 días	2	2.4
Tapón para vino tranquilo (triturado)	10 días	1	2.6
Tapón para vino tranquilo (triturado)	10 días	2	2.4
Tapón para vino tranquilo (entero)	14 días	1	1.8
Tapón para vino tranquilo (entero)	14 días	2	0.2
Tapón para vino tranquilo (triturado)	14 días	1	1.8
Tapón para vino tranquilo (triturado)	14 días	2	0.2
Tapón para vino tranquilo (entero)	21 días	1	3.0
Tapón para vino tranquilo (entero)	21 días	2	2.1
Tapón para vino tranquilo (triturado)	21 días	1	3.0
Tapón para vino tranquilo (triturado)	21 días	2	2.1

En la Tabla núm. 31, se aportan los resultados obtenidos, expresados en ppb de aflatoxinas recuperadas tras 10, 14 ó 21 días de contacto de los tapones para vino espumoso (entero o triturado) con la cepa fúngica, indicando, asimismo, el número de agitaciones a que fueron sometidos.

**Tabla núm. 31.-** Resultados obtenidos en el estudio de la detección de aflatoxinas en los tapones de corcho para vino espumoso inoculados experimentalmente con *Penicillium citrinum*.

<b>Tipo de tapón ensayado</b>	<b>Tiempo de contacto hongo/tapón</b>	<b>Número de agitaciones</b>	<b>Aflatoxinas (ppb)</b>
Tapón para vino espumoso (entero)	10 días	1	0.3
Tapón para vino espumoso(entero)	10 días	2	0.2
Tapón para vino espumoso(triturado)	10 días	1	0.3
Tapón para vino espumoso(triturado)	10 días	2	0.2
Tapón para vino espumoso (entero)	14 días	1	0.8
Tapón para vino espumoso(entero)	14 días	2	0.5
Tapón para vino espumoso(triturado)	14 días	1	0.8
Tapón para vino espumoso(triturado)	14 días	2	0.5
Tapón para vino espumoso (entero)	21 días	1	0.3
Tapón para vino espumoso(entero)	21 días	2	0.0
Tapón para vino espumoso (triturado)	21 días	1	0.3
Tapón para vino espumoso(triturado)	21 días	2	0.0

#### 4.9.3. Resultados obtenidos en el estudio de la detección de Aflatoxinas en los tapones inoculados experimentalmente con *Penicillium frequentans*.

En las Tablas núms. 32 y 33 se resumen los resultados obtenidos en el estudio de la detección de aflatoxinas en los tapones de corcho inoculados experimentalmente con una cepa de *Penicillium frequentans*.

En la Tabla núm. 32, se aportan los resultados obtenidos, expresados en ppb de aflatoxinas recuperadas tras 10, 14 ó 21 días de contacto de los tapones para vino tranquilo (entero o triturado) con la cepa fúngica, indicando, asimismo, el número de agitaciones a que fueron sometidos.

Tabla núm. 32.- Resultados obtenidos en el estudio de la detección de aflatoxinas en los tapones de corcho para vino tranquilo inoculados experimentalmente con *Penicillium frequentans*.

Tipo de tapón ensayado	Tiempo de contacto hongo/tapón	Número de agitaciones	Aflatoxinas (ppb)
Tapón para vino tranquilo (entero)	10 días	1	1.0
Tapón para vino tranquilo (entero)	10 días	2	0.9
Tapón para vino tranquilo (triturado)	10 días	1	1.0
Tapón para vino tranquilo (triturado)	10 días	2	0.9
Tapón para vino tranquilo (entero)	14 días	1	0.7
Tapón para vino tranquilo (entero)	14 días	2	1.1
Tapón para vino tranquilo (triturado)	14 días	1	0.7
Tapón para vino tranquilo (triturado)	14 días	2	1.1
Tapón para vino tranquilo (entero)	21 días	1	1.0
Tapón para vino tranquilo (entero)	21 días	2	1.1
Tapón para vino tranquilo (triturado)	21 días	1	1.0
Tapón para vino tranquilo (triturado)	21 días	2	1.1

En la Tabla núm. 33, se aportan los resultados obtenidos, expresados en ppb de aflatoxinas recuperadas tras 10, 14 ó 21 días de contacto de los tapones para vino espumoso (entero o triturado) con la cepa fúngica, indicando, asimismo, el número de agitaciones a que fueron sometidos.

**Tabla núm. 33.-** Resultados obtenidos en el estudio de la detección de aflatoxinas en los tapones de corcho para vino espumoso inoculados experimentalmente con *Penicillium frequentans*.

<b>Tipo de tapón ensayado</b>	<b>Tiempo de contacto hongo/tapón</b>	<b>Número de agitaciones</b>	<b>Aflatoxinas (ppb)</b>
Tapón para vino espumoso (entero)	10 días	1	1.9
Tapón para vino espumoso(entero)	10 días	2	1.7
Tapón para vino espumoso(triturado)	10 días	1	1.9
Tapón para vino espumoso(triturado)	10 días	2	1.7
Tapón para vino espumoso (entero)	14 días	1	2.4
Tapón para vino espumoso(entero)	14 días	2	1.1
Tapón para vino espumoso(triturado)	14 días	1	2.4
Tapón para vino espumoso(triturado)	14 días	2	1.1
Tapón para vino espumoso (entero)	21 días	1	1.7
Tapón para vino espumoso(entero)	21 días	2	0.9
Tapón para vino espumoso (triturado)	21 días	1	1.7
Tapón para vino espumoso(triturado)	21 días	2	0.9



#### 4.9.4. Resultados obtenidos en el estudio de la detección de Ocratoxina A en los tapones inoculados experimentalmente con *Penicillium purpurescens*.

En las Tablas núms. 34 y 35 se resumen los resultados obtenidos en el estudio de la detección de Ocratoxina A en los tapones de corcho inoculados experimentalmente con una cepa de *Penicillium purpurescens*.

En la Tabla núm. 34, se aportan los resultados obtenidos, expresados en ppb de Ocratoxina A recuperada tras 7, 14 ó 21 días de contacto de los tapones para vino tranquilo (entero o triturado) con la cepa fúngica, indicando, asimismo, el número de agitaciones a que fueron sometidos.

Tabla núm. 34.- Resultados obtenidos en el estudio de la detección de Ocratoxina A en los tapones de corcho para vino tranquilo inoculados experimentalmente con *Penicillium purpurescens*.

<b>Tipo de tapón ensayado</b>	<b>Tiempo de contacto hongo/tapón</b>	<b>Número de agitaciones</b>	<b>Ocratoxina A (ppb)</b>
Tapón para vino tranquilo (entero)	7 días	1	2.0
Tapón para vino tranquilo (entero)	7 días	2	7.3
Tapón para vino tranquilo (triturado)	7 días	1	2.0
Tapón para vino tranquilo (triturado)	7 días	2	7.3
Tapón para vino tranquilo (entero)	14 días	1	6.2
Tapón para vino tranquilo (entero)	14 días	2	7.7
Tapón para vino tranquilo (triturado)	14 días	1	6.2
Tapón para vino tranquilo (triturado)	14 días	2	7.7
Tapón para vino tranquilo (entero)	21 días	1	7.9
Tapón para vino tranquilo (entero)	21 días	2	1.7
Tapón para vino tranquilo (triturado)	21 días	1	7.9
Tapón para vino tranquilo (triturado)	21 días	2	1.7

En la Tabla núm. 35, se aportan los resultados obtenidos, expresados en ppb de Ocratoxina A recuperada tras 7, 14 ó 21 días de contacto de los tapones para vino espumoso (entero o triturado) con la cepa fúngica, se indica asimismo, el número de agitaciones a que fueron sometidos.

**Tabla núm. 35.-** Resultados obtenidos en el estudio de la detección de Ocratoxina A en los tapones de corcho para vino espumoso inoculados experimentalmente con *Penicillium purpurescens*.

<b>Tipo de tapón ensayado</b>	<b>Tiempo de contacto hongo/tapón</b>	<b>Número de agitaciones</b>	<b>Ocratoxina A (ppb)</b>
Tapón para vino espumoso (entero)	7 días	1	7.0
Tapón para vino espumoso(entero)	7 días	2	6.5
Tapón para vino espumoso(triturado)	7 días	1	7.0
Tapón para vino espumoso(triturado)	7 días	2	6.5
Tapón para vino espumoso (entero)	14 días	1	3.0
Tapón para vino espumoso(entero)	14 días	2	3.5
Tapón para vino espumoso(triturado)	14 días	1	3.0
Tapón para vino espumoso(triturado)	14 días	2	3.5
Tapón para vino espumoso (entero)	21 días	1	6.1
Tapón para vino espumoso(entero)	21 días	2	8.8
Tapón para vino espumoso (triturado)	21 días	1	6.1
Tapón para vino espumoso(triturado)	21 días	2	8.8

#### 4.9.5. Resultados obtenidos en el estudio de la detección de Deoxinivalenol en los tapones inoculados experimentalmente con *Fusarium moniliforme*.

En las Tablas núms. 36 y 37 se resumen los resultados obtenidos en el estudio de la detección de DON en los tapones de corcho inoculados experimentalmente con una cepa de *Fusarium moniliforme*.

En la Tabla núm.36, portan los resultados obtenidos, expresados en ppm de DON recuperadas tras 10, 14 ó 21 días de contacto de los tapones para vino tranquilo (entero o triturado) con la cepa fúngica, se indica asimismo, el número de agitaciones a que fueron sometidos.

Tabla núm. 36.- Resultados obtenidos en el estudio de la detección de DON en los tapones de corcho para vino tranquilo inoculados experimentalmente con *Fusarium moniliforme*.

<b>Tipo de tapón ensayado</b>	<b>Tiempo de contacto hongo/tapón</b>	<b>Número de agitaciones</b>	<b>DON (ppm)</b>
Tapón para vino tranquilo (entero)	10 días	1	0.2
Tapón para vino tranquilo (entero)	10 días	2	0.0
Tapón para vino tranquilo (triturado)	10 días	1	0.1
Tapón para vino tranquilo (triturado)	10 días	2	2.7
Tapón para vino tranquilo (entero)	14 días	1	0.3
Tapón para vino tranquilo (entero)	14 días	2	0.8
Tapón para vino tranquilo (triturado)	14 días	1	0.3
Tapón para vino tranquilo (triturado)	14 días	2	0.8
Tapón para vino tranquilo (entero)	21 días	1	0.0
Tapón para vino tranquilo (entero)	21 días	2	0.0
Tapón para vino tranquilo (triturado)	21 días	1	0.0
Tapón para vino tranquilo (triturado)	21 días	2	0.0

En la Tabla núm. 37, se aportan los resultados obtenidos, expresados en ppm de DON recuperadas tras 10, 14 ó 21 días de contacto de los tapones para vino espumoso (entero o triturado) con la cepa fúngica, indicando, asimismo, el número de agitaciones a que fueron sometidos.

**Tabla núm. 37.-** Resultados obtenidos en el estudio de la detección de DON en los tapones de corcho para vino espumoso inoculados experimentalmente con *Fusarium moniliforme*.

<b>Tipo de tapón ensayado</b>	<b>Tiempo de contacto hongo/tapón</b>	<b>Número de agitaciones</b>	<b>DON (ppm)</b>
Tapón para vino espumoso (entero)	10 días	1	0.2
Tapón para vino espumoso(entero)	10 días	2	0.2
Tapón para vino espumoso(triturado)	10 días	1	0.0
Tapón para vino espumoso(triturado)	10 días	2	0.0
Tapón para vino espumoso (entero)	14 días	1	0.0
Tapón para vino espumoso(entero)	14 días	2	0.0
Tapón para vino espumoso(triturado)	14 días	1	0.0
Tapón para vino espumoso(triturado)	14 días	2	0.0
Tapón para vino espumoso (entero)	21 días	1	0.0
Tapón para vino espumoso(entero)	21 días	2	0.0
Tapón para vino espumoso (triturado)	21 días	1	0.0
Tapón para vino espumoso(triturado)	21 días	2	0.0

#### 4.9.6. Resultados obtenidos en el estudio de la detección de Fumonisinias en los tapones inoculados experimentalmente con *Fusarium moniliforme*.

En las Tablas núms. 38 y 39, se resumen los resultados obtenidos en el estudio de la detección de fumonisinias en los tapones de corcho inoculados experimentalmente con una cepa de *Fusarium moniliforme*.

En la Tabla núm. 38, se aportan los resultados obtenidos, expresados en ppm de fumonisinias recuperadas tras 7, 14 ó 21 días de contacto de los tapones para vino tranquilo (entero o triturado) con la cepa fúngica, asimismo se indica el número de agitaciones a que fueron sometidos.

Tabla núm. 38.- Resultados obtenidos en el estudio de la detección de fumonisinias en los tapones de corcho para vino tranquilo inoculados experimentalmente con *Fusarium moniliforme*.

<b>Tipo de tapón ensayado</b>	<b>Tiempo de contacto hongo/tapón</b>	<b>Número de agitaciones</b>	<b>Fumonisinias (ppm)</b>
Tapón para vino tranquilo (entero)	7 días	1	0.0
Tapón para vino tranquilo (entero)	7 días	2	0.3
Tapón para vino tranquilo (triturado)	7 días	1	0.3
Tapón para vino tranquilo (triturado)	7 días	2	0.3
Tapón para vino tranquilo (entero)	14 días	1	0.4
Tapón para vino tranquilo (entero)	14 días	2	0.4
Tapón para vino tranquilo (triturado)	14 días	1	0.4
Tapón para vino tranquilo (triturado)	14 días	2	0.4
Tapón para vino tranquilo (entero)	21 días	1	0.1
Tapón para vino tranquilo (entero)	21 días	2	0.4
Tapón para vino tranquilo (triturado)	21 días	1	0.1
Tapón para vino tranquilo (triturado)	21 días	2	0.4

En la Tabla núm. 39, se aportan los resultados obtenidos, expresados en ppb de fumonisinas recuperadas tras 7, 14 ó 21 días de contacto de los tapones para vino espumoso (entero o triturado) con la cepa fúngica, indicando asimismo, el número de agitaciones a que fueron sometidos.

**Tabla núm. 39.-** Resultados obtenidos en el estudio de la detección de fumonisinas en los tapones de corcho para vino espumoso inoculados experimentalmente con *Fusarium moniliforme*.

<b>Tipo de tapón ensayado</b>	<b>Tiempo de contacto hongo/tapón</b>	<b>Número de agitaciones</b>	<b>Fumonisinias (ppm)</b>
Tapón para vino espumoso (entero)	7 días	1	0.0
Tapón para vino espumoso(entero)	7 días	2	0.0
Tapón para vino espumoso(triturado)	7 días	1	0.0
Tapón para vino espumoso(triturado)	7 días	2	0.0
Tapón para vino espumoso (entero)	14 días	1	0.0
Tapón para vino espumoso(entero)	14 días	2	0.0
Tapón para vino espumoso(triturado)	14 días	1	0.0
Tapón para vino espumoso(triturado)	14 días	2	0.0
Tapón para vino espumoso (entero)	21 días	1	0.5
Tapón para vino espumoso(entero)	21 días	2	0.4
Tapón para vino espumoso (triturado)	21 días	1	0.5
Tapón para vino espumoso(triturado)	21 días	2	0.4

#### 4.9.7. Resultados obtenidos en el estudio de la detección de Zearalenona en los tapones inoculados experimentalmente con *Fusarium moniliforme*.

En las Tablas núms. 40 y 41 se resumen los resultados obtenidos en el estudio de la detección de zearalenona en los tapones de corcho inoculados experimentalmente con una cepa de *Fusarium moniliforme*.

En la Tabla núm. 40 se aportan los resultados obtenidos, expresados en ppb de zearalenona recuperadas tras 7, 14 ó 21 días de contacto de los tapones para vino tranquilo (entero o triturado) con la cepa fúngica, se indica asimismo, el número de agitaciones a que fueron sometidos.

Tabla núm. 40.- Resultados obtenidos en el estudio de la detección de zearalenona en los tapones de corcho para vino tranquilo inoculados experimentalmente con *Fusarium moniliforme*.

<b>Tipo de tapón ensayado</b>	<b>Tiempo de contacto hongo/tapón</b>	<b>Número de agitaciones</b>	<b>Zearalenona (ppb)</b>
Tapón para vino tranquilo (entero)	7 días	1	0.0
Tapón para vino tranquilo (entero)	7 días	2	0.0
Tapón para vino tranquilo (triturado)	7 días	1	0.0
Tapón para vino tranquilo (triturado)	7 días	2	14.3
Tapón para vino tranquilo (entero)	14 días	1	0.0
Tapón para vino tranquilo (entero)	14 días	2	0.0
Tapón para vino tranquilo (triturado)	14 días	1	0.0
Tapón para vino tranquilo (triturado)	14 días	2	0.0
Tapón para vino tranquilo (entero)	21 días	1	38.9
Tapón para vino tranquilo (entero)	21 días	2	0.0
apón para vino tranquilo (triturado)	21 días	1	38.9
Tapón para vino tranquilo (triturado)	21 días	2	0.0

En la Tabla núm. 41, se aportan los resultados obtenidos, expresados en ppb de zearalenona recuperadas tras 7, 14 ó 21 días de contacto de los tapones para vino espumoso (entero o triturado) con la cepa fúngica, asimismo se detalla el número de agitaciones a que fueron sometidos.

**Tabla núm. 41.-** Resultados obtenidos en el estudio de la detección de zearalenona en los tapones de corcho para vino espumoso inoculados experimentalmente con *Fusarium moniliforme*.

<b>Tipo de tapón ensayado</b>	<b>Tiempo de contacto hongo/tapón</b>	<b>Número de agitaciones</b>	<b>Zearalenona (ppb)</b>
Tapón para vino espumoso (entero)	7 días	1	0.0
Tapón para vino espumoso(entero)	7 días	2	0.0
Tapón para vino espumoso(triturado)	7 días	1	0.0
Tapón para vino espumoso(triturado)	7 días	2	24.5
Tapón para vino espumoso (entero)	14 días	1	34.5
Tapón para vino espumoso(entero)	14 días	2	4.3
Tapón para vino espumoso(triturado)	14 días	1	34.5
Tapón para vino espumoso(triturado)	14 días	2	4.3
Tapón para vino espumoso (entero)	21 días	1	0.0
Tapón para vino espumoso(entero)	21 días	2	115.8
Tapón para vino espumoso (triturado)	21 días	1	0.0
Tapón para vino espumoso(triturado)	21 días	2	115.8



#### 4.9.8. Resultados obtenidos en el estudio de la detección de Ocratoxina A en los taponos inoculados experimentalmente con *Aspergillus ochraceus*.

En las Tablas núms. 42 y 43 se resumen los resultados obtenidos en el estudio de la detección de Ocratoxina A en los taponos de corcho inoculados experimentalmente con una cepa de *Aspergillus ochraceus*.

En la Tabla núm. 42, se aportan los resultados obtenidos, expresados en ppb de Ocratoxina A recuperada tras 7, 14 ó 21 días de contacto de los taponos para vino tranquilo (entero o triturado) con la cepa fúngica, se indica asimismo el número de agitaciones a que fueron sometidos.

Tabla núm. 42.- Resultados obtenidos en el estudio de la detección de Ocratoxina A en los taponos de corcho para vino tranquilo inoculados experimentalmente con *Aspergillus ochraceus*.

<b>Tipo de tapón ensayado</b>	<b>Tiempo de contacto hongo/tapón</b>	<b>Número de agitaciones</b>	<b>Ocratoxina A (ppb)</b>
Tapón para vino tranquilo (entero)	7 días	1	0.0
Tapón para vino tranquilo (entero)	7 días	2	0.0
Tapón para vino tranquilo (triturado)	7 días	1	1.5
Tapón para vino tranquilo (triturado)	7 días	2	0.0
Tapón para vino tranquilo (entero)	14 días	1	4.5
Tapón para vino tranquilo (entero)	14 días	2	4.3
Tapón para vino tranquilo (triturado)	14 días	1	4.5
Tapón para vino tranquilo (triturado)	14 días	2	4.3
Tapón para vino tranquilo (entero)	21 días	1	0.2
Tapón para vino tranquilo (entero)	21 días	2	0.5
Tapón para vino tranquilo (triturado)	21 días	1	0.2
Tapón para vino tranquilo (triturado)	21 días	2	0.5

En la Tabla núm. 43 se aportan los resultados obtenidos, expresados en ppb de Ocratoxina A recuperada tras 7, 14 ó 21 días de contacto de los tapones para vino espumoso (entero o triturado) con la cepa fúngica, asimismo se destaca el número de agitaciones a que fueron sometidos.

**Tabla núm. 43.-** Resultados obtenidos en el estudio de la detección de Ocratoxina A en los tapones de corcho para vino espumoso inoculados experimentalmente con *Aspergillus ochraceus*.

<b>Tipo de tapón ensayado</b>	<b>Tiempo de contacto hongo/tapón</b>	<b>Número de agitaciones</b>	<b>Ocratoxina A (ppb)</b>
Tapón para vino espumoso (entero)	7 días	1	0.0
Tapón para vino espumoso(entero)	7 días	2	0.0
Tapón para vino espumoso(triturado)	7 días	1	0.2
Tapón para vino espumoso(triturado)	7 días	2	0.0
Tapón para vino espumoso (entero)	14 días	1	2.8
Tapón para vino espumoso(entero)	14 días	2	1.7
Tapón para vino espumoso(triturado)	14 días	1	2.8
Tapón para vino espumoso(triturado)	14 días	2	1.7
Tapón para vino espumoso (entero)	21 días	1	1.4
Tapón para vino espumoso(entero)	21 días	2	0.5
Tapón para vino espumoso (triturado)	21 días	1	1.4
Tapón para vino espumoso(triturado)	21 días	2	0.5

**4.9.9.- Resultados obtenidos en el estudio de la detección de Ocratoxina A en tapones inoculados experimentalmente con *Aspergillus niger*.**

En las Tablas núms. 44 y 45 se resumen los resultados obtenidos en el estudio de la detección de Ocratoxina A en los tapones de corcho inoculados experimentalmente con una cepa de *Aspergillus niger*.

En la Tabla núm. 44, se aportan los resultados obtenidos, expresados en ppb de Ocratoxina A recuperada tras 10, 14 ó 21 días de contacto de los tapones para vino tranquilo (entero o triturado) con la cepa fúngica, indicando asimismo, el número de agitaciones a que fueron sometidos.

Tabla núm. 44.- Resultados obtenidos en el estudio de la detección de Ocratoxina A en los tapones de corcho para vino tranquilo inoculados experimentalmente con *Aspergillus niger*.

<b>Tipo de tapón ensayado</b>	<b>Tiempo de contacto hongo/tapón</b>	<b>Número de agitaciones</b>	<b>Ocratoxina A (ppb)</b>
Tapón para vino tranquilo (entero)	10 días	1	1.0
Tapón para vino tranquilo (entero)	10 días	2	0.0
Tapón para vino tranquilo (triturado)	10 días	1	1.0
Tapón para vino tranquilo (triturado)	10 días	2	0.0
Tapón para vino tranquilo (entero)	14 días	1	1.4
Tapón para vino tranquilo (entero)	14 días	2	0.4
Tapón para vino tranquilo (triturado)	14 días	1	1.4
Tapón para vino tranquilo (triturado)	14 días	2	0.4
Tapón para vino tranquilo (entero)	21 días	1	1.3
Tapón para vino tranquilo (entero)	21 días	2	0.5
Tapón para vino tranquilo (triturado)	21 días	1	1.3
Tapón para vino tranquilo (triturado)	21 días	2	0.5

En la Tabla núm. 45, se aportan los resultados obtenidos, expresados en ppb de Ocratoxina A recuperadas tras 10, 14 ó 21 días de contacto de los tapones para vino espumoso (entero o triturado) con la cepa fúngica, indicando asimismo el número de agitaciones a que fueron sometidos.

Tabla núm. 45 .- Resultados obtenidos en el estudio de la detección de Ocratoxina A en los tapones de corcho para vino espumoso inoculados experimentalmente con *Aspergillus niger*.

<b>Tipo de tapón ensayado</b>	<b>Tiempo de contacto hongo/tapón</b>	<b>Número de agitaciones</b>	<b>Ocratoxina A (ppb)</b>
Tapón para vino espumoso (entero)	10 días	1	0.6
Tapón para vino espumoso(entero)	10 días	2	0.4
Tapón para vino espumoso(triturado)	10 días	1	0.6
Tapón para vino espumoso(triturado)	10 días	2	0.4
Tapón para vino espumoso (entero)	14 días	1	0.9
Tapón para vino espumoso(entero)	14 días	2	0.3
Tapón para vino espumoso(triturado)	14 días	1	0.9
Tapón para vino espumoso(triturado)	14 días	2	0.3
Tapón para vino espumoso (entero)	21 días	1	0.8
Tapón para vino espumoso(entero)	21 días	2	0.3
Tapón para vino espumoso (triturado)	21 días	1	0.8
Tapón para vino espumoso(triturado)	21 días	2	0.3

#### 4.10. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LAS POSIBLES MIGRACIONES DE LAS MICOTOXINAS INOCULADAS

En las Tablas siguientes se aportan los resultados obtenidos tras la inoculación experimental de las diferentes micotoxinas a tapones de corcho y la posible migración de las mismas a los vinos en contacto con los tapones inoculados.

Antes de iniciar el estudio se verificó la ausencia de micotoxinas en las muestras de vino tranquilo y espumoso.

Tabla núm. 46.- Resultados de los valores obtenidos tras la inoculación de Aflatoxinas en tapones para vino tranquilo o espumosos y la posible migración en el vino tranquilo o espumosos en contacto.

Identificación muestra	Aflatoxinas (ppb) detectadas en tapones	Aflatoxinas (ppb) detectadas en vino tranquilo o espumoso
Tapón de vino tranquilo 1	0.9	0.0
Tapón de vino tranquilo 2	0.6	0.0
Tapón de vino tranquilo 3	1.6	0.0
Tapón de vino tranquilo 4	1.5	0.0
Tapón de vino tranquilo 5	2.4	0.0
Tapón de vino tranquilo 6	0.8	0.0
Tapón de vino tranquilo 7	0.6	0.0
Tapón de vino tranquilo 8	1.4	0.0
Tapón de vino tranquilo 9	1.4	0.0
Tapón de vino tranquilo 10	2.4	0.0
Tapón de vino espumoso 1	0.4	0.1
Tapón de vino espumoso 2	0.7	0.0
Tapón de vino espumoso 3	0.2	0.2
Tapón de vino espumoso 4	0.1	0.0
Tapón de vino espumoso 5	0.1	0.0
Tapón de vino espumoso 6	0.5	0.1
Tapón de vino espumoso 7	0.6	0.0
Tapón de vino espumoso 8	0.1	0.0
Tapón de vino espumoso 9	0.1	0.0
Tapón de vino espumoso 10	0.1	0.0

Concentración de Aflatoxinas inoculada en cada tapón:

Tapón de vino espumoso	25 $\mu$ L de concentración 8 ppb
Tapón de vino tranquilo	50 $\mu$ L de concentración 8 ppb

Tabla núm. 47.- Resultados de los valores obtenidos tras la inoculación de DON en tapones para vino tranquilo o espumoso y la posible migración en el vino tranquilo o espumosos en contacto.

<b>Identificación muestra</b>	<b>DON (ppm) detectada en tapones</b>	<b>DON (ppm) detectada en vino tranquilo o espumoso</b>
Tapón de vino tranquilo 1	0.0	0.0
Tapón de vino tranquilo 2	0.0	0.0
Tapón de vino tranquilo 3	0.1	0.0
Tapón de vino tranquilo 4	0.0	0.0
Tapón de vino tranquilo 5	0.1	0.0
Tapón de vino tranquilo 6	0.0	0.0
Tapón de vino tranquilo 7	0.0	0.0
Tapón de vino tranquilo 8	0.1	0.0
Tapón de vino tranquilo 9	0.0	0.0
Tapón de vino tranquilo 10	0.1	0.0
Tapón de vino espumoso 1	0.0	0.0
Tapón de vino espumoso 2	0.0	0.0
Tapón de vino espumoso 3	0.0	0.0
Tapón de vino espumoso 4	0.0	0.0
Tapón de vino espumoso 5	0.0	0.0
Tapón de vino espumoso 6	0.0	0.0
Tapón de vino espumoso 7	0.0	0.0
Tapón de vino espumoso 8	0.0	0.0
Tapón de vino espumoso 9	0.0	0.0
Tapón de vino espumoso 10	0.0	0.0

Concentración de DON inoculada en cada tapón:

Tapón de vino espumoso	25 µL de concentración 3 ppm
Tapón de vino tranquilo	50 µL de concentración 3 ppm

Tabla núm. 48.- Resultados de los valores obtenidos tras la inoculación de Fumonisinias en tapones para vino tranquilo o espumosos y la posible migración en el vino tranquilo o espumoso en contacto.

<b>Identificación muestra</b>	<b>Fumonisinias (ppm) detectadas en tapones</b>	<b>Fumonisinias (ppm) detectadas en vino tranquilo o espumoso</b>
Tapón de vino tranquilo 1	0.0	0.0
Tapón de vino tranquilo 2	0.0	0.0
Tapón de vino tranquilo 3	0.0	0.0
Tapón de vino tranquilo 4	0.0	0.0
Tapón de vino tranquilo 5	0.0	0.0
Tapón de vino tranquilo 6	0.0	0.0
Tapón de vino tranquilo 7	0.0	0.0
Tapón de vino tranquilo 8	0.0	0.0
Tapón de vino tranquilo 9	0.0	0.0
Tapón de vino tranquilo 10	0.0	0.0
Tapón de vino espumoso 1	0.0	0.0
Tapón de vino espumoso 2	0.0	0.0
Tapón de vino espumoso 3	0.0	0.0
Tapón de vino espumoso 4	0.0	0.0
Tapón de vino espumoso 5	0.0	0.0
Tapón de vino espumoso 6	0.0	0.0
Tapón de vino espumoso 7	0.0	0.0
Tapón de vino espumoso 8	0.0	0.0
Tapón de vino espumoso 9	0.0	0.0
Tapón de vino espumoso 10	0.0	0.0

Concentración de Fumonisinias inoculada en cada tapón:

Tapón de vino espumoso	25 µL de concentración 6 ppm
Tapón de vino tranquilo	50 µL de concentración 6 ppm

Tabla núm. 49.- Resultados de los valores obtenidos tras la inoculación de Ocratoxina A en tapones para vino tranquilo o espumosos y la posible migración en el vino tranquilo o espumosos en contacto.

<b>Identificación muestra</b>	<b>Ocratoxina A (ppb) Inoculada a tapones</b>	<b>Ocratoxina A (ppb) detectada en vino tranquilo o espumoso</b>
Tapón de vino tranquilo 1	8.0	0.0
Tapón de vino tranquilo 2	7.0	0.0
Tapón de vino tranquilo 3	5.3	0.0
Tapón de vino tranquilo 4	12.2	0.0
Tapón de vino tranquilo 5	58.5	0.0
Tapón de vino tranquilo 6	4.5	0.7
Tapón de vino tranquilo 7	2.8	0.0
Tapón de vino tranquilo 8	1.0	0.0
Tapón de vino tranquilo 9	10.8	1.3
Tapón de vino tranquilo 10	1.9	0.6
Tapón de vino espumoso 1	0.4	0.0
Tapón de vino espumoso 2	1.7	0.0
Tapón de vino espumoso 3	2.5	0.0
Tapón de vino espumoso 4	1.3	0.3
Tapón de vino espumoso 5	1.6	0.0
Tapón de vino espumoso 6	1.3	0.1
Tapón de vino espumoso 7	1.4	1.6
Tapón de vino espumoso 8	1.6	0.0
Tapón de vino espumoso 9	1.4	1.3
Tapón de vino espumoso 10	1.6	0.0

Concentración de Ocratoxina A inoculada en cada tapón:

Tapón de vino espumoso	25 µL de concentración 25 ppb
Tapón de vino tranquilo	50 µL de concentración 25 ppb



Tabla núm.50.- Resultados de los valores obtenidos tras la inoculación de T-2 en tapones para vino tranquilo o espumosos y la posible migración en el vino tranquilo o espumosos en contacto.

<b>Identificación muestra</b>	<b>T-2 (ppb) Inoculada a tapones</b>	<b>T-2 (ppb) detectada en vino tranquilo o espumoso</b>
Tapón de vino tranquilo 1	12.6	46,4
Tapón de vino tranquilo 2	6.7	0.0
Tapón de vino tranquilo 3	23.4	0.0
Tapón de vino tranquilo 4	51.4	7.0
Tapón de vino tranquilo 5	16.0	0.0
Tapón de vino tranquilo 6	12.6	46,4
Tapón de vino tranquilo 7	6.7	0.0
Tapón de vino tranquilo 8	23.4	0.0
Tapón de vino tranquilo 9	51.4	7.0
Tapón de vino tranquilo 10	16.0	0.0
Tapón de vino espumoso 1	2.5	38.2
Tapón de vino espumoso 2	0.0	0.0
Tapón de vino espumoso 3	0.0	0.0
Tapón de vino espumoso 4	7.8	0.0
Tapón de vino espumoso 5	8.2	0.0
Tapón de vino espumoso 6	2.5	38.2
Tapón de vino espumoso 7	0.0	0.0
Tapón de vino espumoso 8	0.0	0.0
Tapón de vino espumoso 9	7.8	0.0
Tapón de vino espumoso 10	8.2	0.0

Concentración de T-2 inoculada en cada tapón:

Tapón de vino espumoso	25 $\mu$ L de concentración 250 ppb
Tapón de vino tranquilo	50 $\mu$ L de concentración 250 ppb

En la Tabla núm. 51, se resumen los rangos de los porcentajes de recuperación de las micotoxinas inoculadas en los tipos de corcho investigados

Tabla núm. 51.- Resultados de los rangos de porcentajes de recuperación de las micotoxinas inoculadas en los diferentes tipos de tapones de corcho

<b>Micotoxinas</b>	<b>Porcentajes de recuperación en tapones para vino tranquilo</b>	<b>Porcentajes de recuperación en tapones para vino espumoso</b>
<b>Aflatoxina</b>	<b>7,5 – 30 %</b>	<b>1,25 – 8,75 %</b>
<b>Ocratoxina A</b>	<b>4,0 – 74 %</b>	<b>1,6 – 10,0 %</b>
<b>T-2</b>	<b>2,68 – 20,6 %</b>	<b>0 – 3,28 %</b>
<b>DON</b>	<b>0 – 3,33 %</b>	<b>0</b>
<b>Fumonisina</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

#### 4.11. RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA DETECCIÓN DE MICOTOXINAS EN TAPONES DE MERCADO

En las Tablas núm. 52 y 53 se aportan los resultados obtenidos al analizar la presencia de micotoxinas en tapones de mercado para vino tranquilo y para vino espumoso.

La metodología utilizada para la detección de las micotoxinas es la que se resume en el apartado 3. 2.28.

Los resultados de la tabla núm. 52, corresponden a tapones de mercado para vino tranquilo.

Tabla núm. 52.- Resultados correspondientes a la detección de micotoxinas en tapones de mercado para vino tranquilo.

Tapón para vino tranquilo	T-2 (ppb)	Aflatoxinas (ppb)	Zearalenona (ppb)	DON (ppm)	Fumonisinias (ppm)	Ocratoxina A (ppb)
Tapón 1	1.4	1.4	0.0	1.3	0.0	4.6
Tapón 2	0.0	0.8	0.0	0.0	0.0	3.4
Tapón 3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.4
Tapón 4	2.2	0.0	0.0	0.2	0.2	4.7
Tapón 5	0.0	0.3	0.0	0.1	0.1	2.7
Tapón 6	6.4	0.0	0.0	0.0	0.0	4.2
Tapón 7	1.4	1.4	0.0	1.3	0.0	4.6
Tapón 8	0.0	0.8	0.0	0.0	0.0	3.4
Tapón 9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.4
Tapón 10	2.2	0.0	0.0	0.2	0.2	4.7
Tapón 11	0.0	0.3	0.0	0.1	0.1	2.7
Tapón 12	6.4	0.0	0.0	0.0	0.0	4.2

Los resultados de la tabla núm. 53, corresponden a tapones de mercado para vino espumoso.

Tabla núm. 53.- Resultados correspondientes a la detección de micotoxinas en tapones de mercado para vino espumoso.

Tapón para vino espumoso	T-2 (ppb)	Aflatoxinas (ppb)	Zearalenona (ppb)	DON (ppm)	Fumonisinias (ppm)	Ocratoxina A (ppb)
Tapón 1	3.3	3.4	0.0	13.3	0.0	0.1
Tapón 2	10.4	0.0	0.0	17.5	0.2	0.0
Tapón 3	11.9	0.2	0.0	8.5	0.0	0.0
Tapón 4	3.2	0.3	0.0	6.5	0.0	0.1
Tapón 5	24.1	0.0	0.0	0.2	0.1	0.0
Tapón 6	27.3	0.0	0.0	9.3	0.2	0.0
Tapón 7	3.3	3.2	0.0	13.3	0.0	0.1
Tapón 8	10.2	0.0	0.0	17.5	0.2	0.0
Tapón 9	11.7	0.2	0.0	8.5	0.0	0.0
Tapón 10	3.0	0.3	0.0	6.5	0.0	0.1
Tapón 11	24.0	0.0	0.0	0.2	0.1	0.0
Tapón 12	27.1	0.0	0.0	9.3	0.2	0.0

En la Tabla núm. 54, se resumen los valores medios (máximos y mínimos) detectados para cada una de las micotoxinas evaluadas en los tapones de mercado para vino tranquilo y para vino espumoso. No se incluye zearalenona ya que no se detectó en ninguna de las muestras analizadas.

Tabla núm. 54.- Valores medios (máximos y mínimos) detectados para cada una de las micotoxinas investigadas.

	T-2 (ppb)	Aflatoxinas (ppb)	DON (ppm)	Fumonisinias (ppm)	Ocratoxina A (ppb)
Tapón para vino tranquilo	1.66 (6.4-0.0)	0.42 (1.4-0.0)	0.26 (1.3-0.0)	0.05 (0.2-0.0)	3.83 (4.7-2.7)
Tapón para vino espumoso	13.30 (27.1-3.0)	0.64 (3.2-0.0)	8.39 (17.5-0.2)	0.08 (0.2-0.0)	0.03 (0.1-0.0)

En relación con la Ocratoxina A y dada la importancia adquirida por esta micotoxinas en los últimos años se han analizado veinte muestras adicionales para cada uno de los tipos de corcho analizados.

Los resultados se resumen en la Tablas núms. 55 y 56 .

Tabla núm. 55 Resultados de la detección de Ocratoxina A en tapones de mercado para vino tranquilo.

	Ocratoxina A (ppb)
Tapón 1	1.8
Tapón 2	2.1
Tapón 3	0.1
Tapón 4	0.1
Tapón 5	4.2
Tapón 6	2.3
Tapón 7	3.5
Tapón 8	0.3
Tapón 9	0.0
Tapón 10	0.0
Tapón 11	0.2
Tapón 12	0.1
Tapón 13	3.7
Tapón 14	1.6
Tapón 15	4.7
Tapón 16	3.2
Tapón 17	6.1
Tapón 18	5.2
Tapón 19	3.3
Tapón 20	2.0
Valor medio	2.25



Tabla núm.56.- Resultados de la detección de Ocratoxina A en veinte tapones de mercado para vino espumoso.

	Ocratoxina A (ppb)
<b>Tapón 1</b>	<b>1.4</b>
<b>Tapón 2</b>	<b>0.0</b>
<b>Tapón 3</b>	<b>0.8</b>
<b>Tapón 4</b>	<b>0.5</b>
<b>Tapón 5</b>	<b>1.3</b>
<b>Tapón 6</b>	<b>0.0</b>
<b>Tapón 7</b>	<b>0.5</b>
<b>Tapón 8</b>	<b>1.7</b>
<b>Tapón 9</b>	<b>1.8</b>
<b>Tapón 10</b>	<b>0.8</b>
<b>Tapón 11</b>	<b>0.9</b>
<b>Tapón 12</b>	<b>0.3</b>
<b>Tapón 13</b>	<b>2.8</b>
<b>Tapón 14</b>	<b>0.6</b>
<b>Tapón 15</b>	<b>4.0</b>
<b>Tapón 16</b>	<b>0.9</b>
<b>Tapón 17</b>	<b>1.5</b>
<b>Tapón 18</b>	<b>0.3</b>
<b>Tapón 19</b>	<b>2.3</b>
<b>Tapón 20</b>	<b>1.5</b>
<b>Valor medio</b>	<b>1.1955</b>

Los valores máximos obtenidos en los ensayos realizados para la detección e las micotoxinas de mayor interés en Seguridad alimentaria ,así como los relativos a la legislación existente para cada una de ellas se resume en la Tabla núm. 57,

Tabla núm. 57.- Resultados de los valores máximos obtenidos en los ensayos de micotoxinas y la legislación existente para alimentos.

.	Aflatoxinas ppb	Ocratoxina A ppb	DON ppm	Fumonisinias ppm
Tapones inoculados	3,0	8,8	2,7	0,5
Migraciones al vino	0,2	1,6	0,0	0,0
Tapones de mercado	3,2	4,7	17,5	0,2
Legislación para alimentos	4,0	2,0	0,5*	0,4*

\* Estos valores entrarán en vigor a partir del 1 de octubre del 2007.

---

DISCUSIÓN



## 5. DISCUSIÓN

### **5.1. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS Y LEVADURAS A PARTIR DE TAPONES DE CORCHO**

La diversidad de especies de hongos filamentosos aislados a lo largo de nuestro estudio a partir de los tres tipos de tapones de corcho investigados, coinciden en líneas generales por los citados por otros autores (10,15).

La mayoría de los autores que ha realizado estudios sobre la microbiología del corcho no especifican en que estadio del proceso de fabricación han identificado los hongos que enumeran.

Los hongos que hemos identificado en esta investigación, se han obtenido de tapones que estaban preparados para introducir en las botellas de vino tranquilo de vino espumoso.

Merece especial mención el hecho de que se detecta una mayor variabilidad entre las especies aisladas a partir de tapones vino espumoso que en los tapones destinados a otros vinos, este hecho puede ser claramente consecuencia de que los tapones para botellas de vino espumoso no se someten a lavado, durante el proceso de su elaboración, por lo que se eliminan un menor número de cepas fúngicas que en los otros tipos de tapones que en su elaboración incluyen lavados con peróxido de hidrógeno.

En los tres tipos de tapones de corcho analizados se ha evidenciado:

- A) *Monilia sitophila*, en los tapones para vino espumoso y en los aglomerados se han encontrado en el 100 % de las muestras analizadas, mientras que en los tapones para vino se ha encontrado en el 75 % de las muestras analizadas. Esta especie no es productora de ninguna de las micotoxinas analizadas, pero es el principal hongo contaminante en la industria corchera. Centeno, 2001 (15), detectó *Monilia sitophila* en los tapones para vino tranquilo y en los tapones para vino espumosos que analizó en su estudio.
  
- B) *Penicillium frequentans*, en los tapones aglomerados y en los tapones para vinos tranquilos, se ha evidenciado en el 100 % de las muestras analizadas, mientras que en los tapones para vinos espumosos se han encontrado en un 83, 33% de las muestras. Esta especie se ha descrito como productora de micotoxinas y además está relacionado con enfermedades de tipo respiratorio y profesional para el sector corchero siendo considerado agente etiológico del proceso denominado suberosis. Centeno, 2001 (15) no detectó esta especie en ninguno de los tipos de tapón que investigó.

- C) *Penicillium citrinum*, en los tapones para vino tranquilo y en los tapones aglomerados se han encontrado en un 50% de las muestras analizadas. En los tapones para vino espumoso se han detectado en un 66,67 % de las muestras analizadas. Esta especie ha sido descrita como productora de micotoxinas. Centeno, 2001 (15) sólo evidenció esta especie en para vino espumoso.
- D) *Trichoderma viride*, Se ha aislado en el 100 % de las muestras analizadas de tapones para vino tranquilo y aglomerados, mientras que en los tapones para vino espumoso se ha detectado sólo en un 66,67 % de las muestras analizadas. Esta especie no se menciona como productora de ninguna de las micotoxinas legisladas. Centeno, 2001 (15) detectó esta especie en tapones para vino tranquilo y espumoso, en su estudio no analizó tapones de corcho aglomerado.
- E) *Aspergillus flavus*, no se ha detectado en ninguna de las muestras de tapones para vino tranquilo analizadas, pero se evidenció en un 50% de los tapones aglomerados y en un 33,33 % de las muestras de tapones para vino espumoso analizadas. Esta especie se describe como principal productor de aflatoxinas. Centeno, 2001 (15) no detectó esta especie en ninguno de los tipos de tapón de corcho analizados.
- F) *Aspergillus fumigatus*, solo se ha detectado en un 16,67 % de las muestras de tapones para vino espumoso analizadas, no habiéndose aislado en los otros tipos de tapones de corcho evaluados. No es productor de ninguna de las micotoxinas legisladas. Centeno, 2001 (15) detectó esta especie en los tapones para vino tranquilo y para vino espumoso.
- G) *Alternaria alternata*, se ha encontrado en un 100 % de las muestras de tapones aglomerados, en un 75 % de las muestras de tapones de vino tranquilo y en un 33,33 % de las muestras de tapones para vinos espumosos analizadas. No es productor de ninguna de las micotoxinas legisladas. Centeno, 2001 (15) sólo detectó esta especie en los tapones de corcho para vino espumoso.
- H) *Cladosporium herbarum*, se ha aislado en el 100 % de las muestras de tapones aglomerados, en un 50 % de las muestras de tapones para vino tranquilo y en un 33,33 % de las muestras de tapones de vino espumoso analizadas. No es productor de ninguna de las micotoxinas legisladas. Centeno, 2001 (15) no evidenció esta cepa en ningún tipo de tapón corcho.
- I) *Fusarium moniliforme*, se ha detectado en el 50% de las muestras de tapones aglomerados y en un 25% de las muestras de tapones para vino tranquilo. No se han detectado en las muestras para tapones de vino espumoso. Esta especie se describe como productora de fumonisinas y de Toxinas T-2. Centeno, 2001 (15) detectó esta especie sólo en los tapones para vino espumoso.
- J) *Rhizopus arrhizus*, no se ha detectado en ninguna de las muestras de tapones de vino tranquilo analizadas, mientras que si se ha detectado en un 50 % de las muestras analizadas de tapones de vino espumoso y de tapones aglomerados. No es productor de ninguna de las micotoxinas legisladas. Centeno, 2001

(15), no ha aislado cepas de esta especie en ninguno de los tipos de tapón de corcho que evaluó.

- K) *Mucor hiemalis*, se ha detectado en un 50% de las muestras analizadas de tapones de vino tranquilo y de tapones aglomerados y en un 16,67 % de las muestras de tapones para vino espumoso analizadas. No es productor de ninguna de las micotoxinas legisladas. Centeno, 2001 (15) no detectó esta especie en ningún tipo de tapón de corcho.
- L) *Aureobasidium pullulans*, no se ha detectada en los tapones aglomerados, mientras que se evidenció en un 25% de las muestras de tapones de vino tranquilo y en un 16,67 % de las muestras de tapones para vino espumoso analizadas. No es productor de ninguna de las micotoxinas legisladas. Centeno, 2001 (15) no detectó esta especie en ninguno de los tipos de tapón de corcho analizados en su estudio.
- M) *Rhodotorula glutinis*, se ha detectado en un 50% de las muestras de tapones aglomerados y en un 16,67 % de las muestras de tapones para vino espumoso analizadas. No se ha detectado en las muestras analizadas para tapones para vino tranquilo. No es productor de ninguna de las micotoxinas legisladas. Centeno, 2001 (15) evidenció esta levadura en los tapones para vino tranquilo y en los tapones para vino espumoso.

La ausencia de *Rhodotorula glutinis* en tapones para vino tranquilo está directamente relacionado con la ausencia de arandelas en la elaboración de este tipo de tapones. Asimismo se observa que existe una correlación entre la presencia o ausencia de esta levadura con la presencia o ausencia de cepas de *Rhizopus arrhizus*.

Centeno, 2001 (15) detectó asimismo *Aspergillus niger*, descrito como productor de micotoxinas, en los tapones para vino tranquilo y en los tapones para vino espumoso. En los tapones para vino espumoso, aisló asimismo *Penicillium velutinum*, *Mucor plumbeus* y *Fusarium solanaceum* (especie descrita como productora de Toxina T-2).

## **5.2. DISCUSION DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LAS CEPAS HABITUALMENTE AISLADAS DE TAPONES DE CORCHO**

Los resultados obtenidos al evaluar la posible capacidad inhibidora de las cepas de hongos miceliarios habitualmente aisladas de tapones de corcho nos permiten aportar que todos los hongos ensayados son capaces de inhibir el desarrollo de *Monilia sitophila* ya que crecen en la placa sembrada con este hongo, mientras que éste no se desarrolla en presencia de discos obtenidos con cultivos de las restantes cepas, objeto de estudio.

La capacidad inhibidora de las diversas cepas fúngicas aisladas de los tapones de corcho investigados frente a *Monilia sitophila*, no se manifiesta en condiciones de trabajo habituales con las planchas de corcho. En los almacenes de almacenamiento de las planchas de corcho después de procederse al tratamiento de hervido de las mismas, se observa de forma natural un desarrollo masivo de *Monilia sitophila* que recubre en pocos días toda la superficie de las planchas de corcho, momento en el que se considera en la industria corchera tradicional que las planchas están preparadas adecuadamente para proceder a su corte y a la obtención de los tapones de corcho.

## **5.3.- DISCUSION DE LOS RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS CEPAS HABITUALMENTE AISLADAS DE LOS TAPONES DE CORCHO.**

Las enzimas producidas por todas las cepas de los hongos filamentosos evaluadas por el método del API ZYM® fueron:

Esterasa C1, Leucina arilamidasa, Fosfatasa ácida, Naftol-A-S-BI-fosfohidrolasa y  $\beta$ - glucosidasa.

La mayoría de las cepas ensayadas presentó:

Fosfatasa alcalina y Esterasa lipasa C8.

Del estudio de la actividad enzimática de las ocho cepas fúngicas evaluadas podemos destacar que las que presentaron mayor actividad enzimática fueron:

*Monilia sitophila*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*,  
*Penicillium frequentans* y *Penicillium purpurescens*

Cabe señalar la detección de las actividades enzimáticas que se resumen a continuación en las cepas fúngicas aisladas de los tapones de corcho investigados:

- A) **Fosfatasa alcalina:** detectada en *Monilia sitophila* y *Aspergillus ochraceus*
  
- B) **Fosfatasa àcida:** detectada en *Monilia sitophila*, *Penicillium frequentans*, *Aspergillus ochraceus* y *Fusarium moniliforme*,
  
- C) **Naftol-A-S-BI-fosfohidrolasa:** detectada en *Monilia sitophila*, *Penicillium frequentans*, y *Fusarium moniliforme*.
  
- D)  **$\alpha$  – galactosidasa:** detectada en *Penicillium frequentans*
  
- E)  **$\alpha$  – glucosidasa :** detectada en *Penicillium frequentans* y *Aspergillus ochraceus*
  
- F)  **$\beta$ - glucosidasa:** detectada en *Monilia sitophila*, *Penicillium purpurescens* y *Aspergillus ochraceus*.
  
- G) **N- acetil- $\beta$ - glucosaminidasa:** detectada en *Penicillium frequentans*, *Penicillium purpurescens* y *Aspergillus ochraceus*.

Las actividades enzimáticas permiten a las cepas que las presentan modificar las características del sustrato sobre el que se desarrollan, en este caso el corcho. Destacaremos, a continuación las actividades detectadas así como la posible relación con su actividad sobre el corcho y sobre su microbiota.

Las estererasas son enzimas extracelulares producidos por hongos filamentosos, levaduras y bacterias, que actúan rompiendo los enlaces ésteres, atravesando polisacáridos de la pared celular y la lignina y de este modo permiten que la pared celular donde actúan sea más accesible a la acción de las hidrolasas, que a su vez actúan hidrolizando compuestos de altos pesos moleculares como carbohidratos y proteínas (18,79 y 108).

Los enzimas estererasas proporcionan a los microorganismos que las poseen la capacidad de poder actuar sobre los lípidos. Este hecho facilita a los microorganismos estererasas positivos una clara actividad sobre bacterias Gram negativas así como de las endosporas de bacterias Gram positivas de las que los lípidos son un componente fundamental.

En la degradación de la celulosa a glucosa, juega un papel primordial la  $\beta$ -glucosidasa. Esta enzima se encuentra asociada a la celulasa, complejo enzimático formado por endo y exoglucanasas que son indispensables para la completa hidrólisis de la celulosa (27, 91, 99 , (109). Los microorganismos que poseen este enzima son capaces de colaborar activamente en la degradación de sustratos en los que la celulosa sea un componente fundamental, como es el caso del corcho

La detección del enzima N- acetil- $\beta$ - glucosaminidasa, permite señalar que los microorganismos que la poseen son capaces de destruir la pared de las bacterias ya que un componente fundamental de las paredes bacterianas es la N-acetil-glucosamina.

La presencia de fosfatasas puede inhibir la formación de los ácidos teicoicos, componentes de las paredes de las Bacterias Gram positivas y asimismo pueden incidir negativamente en la degradación de la glucosa como fuente de energía.

La detección de leucina arilamidasa, cistina arilamidasa y valina arilamidasa permite señalar la interferencia de las cepas que las poseen con la síntesis proteica.

Ninguna de las cepas asiladas de los tapones de corcho investigados, presentó las siguientes actividades: tripsina, quimotripsina,  $\alpha$ -manosidasa ni  $\alpha$ - fucosidasa.

#### **5.4.- DISCUSION DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA REALIZACIÓN DE LAS CROMATOGRAFÍAS EN CAPA FINA**

En las cromatografías en capa fina realizadas a partir de los cultivos de *Aspergillus niger* a los 7, 14 y 21 días de incubación, se detectan Ocratoxina A, cuando el líquido de desarrollo es cloroformo: metanol en la proporción 4:1, mientras que en la proporción 1:1 no se detecta.

En las cromatografías en capa fina realizadas a partir de los cultivos de *Fusarium moniliforme* a los 7,14 y 21 días de desarrollo, se detectan zearalenonas cuando el líquido de desarrollo es cloroformo: acetato de etilo: ácido acético en la proporción (6:3:1), mientras que cuando el líquido de desarrollo es cloroformo: metanol, no se detecta en ninguna de las proporciones utilizadas.

En las cromatografías en capa fina realizadas a partir de los cultivos de *Aspergillus ochraceus* a los 7,14 y 21 días de incubación, se detectan Ocratoxina A, en las dos proporciones de líquido de desarrollo utilizadas de cloroformo: metanol (1:1) y (4:1)

En las cromatografías en capa fina realizadas a partir de los cultivos de *Aspergillus flavus* a los 7, 14 y 21 días de crecimiento se detectan Aflatoxinas en las dos proporciones de líquido de desarrollo utilizadas de cloroformo: metanol (1:1) y (4:1)

En las cromatografías en capa fina realizadas a partir de los cultivos de *Penicillium citrinum* a los 7, 14 y 21 días de crecimiento, se detectan aflatoxinas en las dos proporciones de líquido de desarrollo utilizadas de cloroformo: metanol (1:1) y (4:1)

En las cromatografías en capa fina realizadas a partir de los cultivos de *Penicillium frequentans* a los 7, 14 y 21 días de inoculación, se detectan aflatoxinas sólo a los 21 días en las dos proporciones de líquido de desarrollo utilizadas cloroformo:metanol (1:1) y (4:1)

En las cromatografías en capa fina realizadas a partir de los cultivos de *Penicillium purpurescens* a los 7, 14 y 21 días de crecimiento, sólo se detectan aflatoxinas en la proporción 1:1 del líquido de desarrollo cloroformo: metanol.

## **5.5.- DISCUSION DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL PROCESO DE ESTERILIZACIÓN DE TAPONES.**

Al someter los tapones a la esterilización especificada en el capítulo de Material y Métodos, se observa que los tapones se modifican en los siguientes aspectos:

- En el diámetro de los tapones para vino, se observa una ovalización superior a la marcada por las Normas existentes.
- En la longitud, no presentan simetría.
- En el aspecto físico, tras a esterilización los tapones, están deformados y las arandelas de los tapones de vino espumoso no se han desunido.
- Los tres tipos de tapones analizados presentan una humedad superior a la marcada por las Normativas existentes.
- No se ha detectado presencia de hongos filamentosos después de someterlos al método antes mencionado.
- La densidad media esta en los límites superiores de las normativas para los tapones naturales para vino y los aglomerados.
- La fuerza de extracción es superior a los límites marcados por las normativas existentes para los tapones naturales para vino y los aglomerados.
- La tensión por rotura es inferior al valor especificado por la normativa existente para los tapones de vino espumoso.

La importancia de estos resultados reside en que a la vista de los mismos y de las modificaciones que sufren los tapones, éstos, no pueden ser sometidos a esterilización, ya que una vez esterilizados no cumplen con los requisitos exigidos a nivel de legislación.

Los estudios tras la esterilización de los tapones se llevaron a cabo, pensando en la posibilidad de que la esterilización pudiera ser un buen sustituto de los sistemas de mantenimiento actual de los tapones de corcho y asimismo de facilitar la elaboración de los mismos, sustituyendo la esterilización de los tapones por los hervidos y por el procesos de maduración fúngica que se llevan a cabo en la actualidad.

#### **5.6.- DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS DETERMINACIONES DE pH DE LOS DIVERSOS TAPONES INVESTIGADOS**

Los hongos se desarrollan en condiciones óptimas en general a intervalos de pH de 2,5 a 7,5 por tanto pueden crecer óptimamente a pH ácido, en el que son capaces de producir y acumular micotoxinas.

Los valores encontrados de pH en los tapones de corcho oscilan entre 5,0 para los tapones de vino tranquilo; 6,0 para los tapones aglomerados y 6,5 para los tapones de vino espumoso, por tanto todos los tipos de tapones de corcho analizados se encuentran en los intervalos de pH óptimos para que crezcan los hongos y para que, en su caso, puedan elaborar y acumular micotoxinas.

#### **5. 7.- DISCUSION DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA RECUPERACIÓN DE CEPAS FÚNGICAS EXPERIMENTALMENTE INOCULADAS**

Las diferentes suspensiones madres de las cepas de hongos filamentosos productores de micotoxinas poseen concentraciones superiores a  $10^6$  UFC/mL, excepto la solución madre de *Aspergillus ochraceus*, que presenta una concentración de  $1,2 \cdot 10^5$  UFC/mL, que es el límite admitido por las normas N.C.S. 0.21 / 94 “Tapones de corcho natural semielaborados para vinos tranquilos” y la N.C.S. 0.22/94 “Discos de corcho natural para tapones para vinos espumosos



A pesar de haber inoculado los tapones con estos niveles de concentración, los porcentajes de recuperación de los hongos en contacto con los tapones son muy bajos.

- a) En el caso de *Aspergillus flavus* para tapones de vino espumoso, la recuperación es del orden del  $1 \times 10^{-3} \%$  ( $2 \times 10^5$  UFC) y para tapones de vino tranquilo es del  $0,15 \%$  ( $3 \times 10^7$  UFC).
  
- b) En el caso de *Aspergillus niger* para tapones de vino espumoso, la recuperación es del orden  $2 \times 10^{-5} \%$  ( $1 \times 10^5$  UFC) y para los tapones de vino tranquilo es del  $7,5 \times 10^{-7} \%$  ( $3 \times 10^2$  UFC).
  
- c) En el caso de *Aspergillus ochraceus* para tapones de vino espumoso, la recuperación es del orden del  $0,15 \%$  ( $3 \times 10^2$  UFC) y para tapones de vino tranquilo es del orden del  $0,20 \%$  ( $4 \times 10^2$  UFC).
  
- d) En el caso de *Fusarium moniliforme* para tapones de vino espumoso, la recuperación es del orden del  $6,7 \times 10^{-3} \%$  ( $2 \times 10^3$  UFC) y para tapones de vino tranquilo es del orden del  $0,03 \%$  ( $9 \times 10^2$  UFC).
  
- e) En el caso de *Penicillium citrinum* para tapones de vino espumoso, la recuperación es del orden del  $0,03 \%$  ( $3 \times 10^3$  UFC) y para tapones de vino tranquilo es del orden del  $0,06 \%$  ( $6 \times 10^3$  UFC).
  
- f) En el caso de *Penicillium frequentans* para tapones de vino espumoso, la recuperación es del orden del  $0,01 \%$  ( $3 \times 10^3$  UFC) y para tapones de vino tranquilo es del orden del  $3,3 \times 10^{-3} \%$  ( $1 \times 10^3$  UFC).
  
- g) En el caso de *Penicillium purpurescens* para tapones de vino espumoso, la recuperación es orden del  $1,3 \times 10^{-3} \%$  ( $4 \times 10^4$  UFC) y para tapones de vino tranquilo es del orden del  $1 \times 10^{-4} \%$  ( $3 \times 10^3$  UFC).

## **5.8. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE LA DETECCIÓN DE MICOTOXINAS EN LOS TAPONES INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE CON CEPAS PRODUCTORAS.**

### **5.8.1. Discusión de los resultados obtenidos en el estudio de la detección de Aflatoxinas en los tapones inoculados experimentalmente con *Aspergillus flavus*.**

En los tapones de vino tranquilo, los valores más elevados de detección de aflatoxinas, se obtienen a los 7 días de la inoculación y coincide con la muestra triturada y en la que se han juntado las dos agitaciones, el valor es de 1,2 ppb, a los 14 días de la inoculación en la muestra triturada se obtiene un valor de 1 ppb, mientras que en las muestras de los 21 días de la inoculación todos los valores son cero, tanto de la muestra entera como la triturada.

En los tapones de vino espumoso, casi todos los valores obtenidos son cero, únicamente se obtiene un 0,3 ppb en la muestra entera a los 14 días de la inoculación y 0,2 ppb en la muestra entera a los 21 días de la inoculación.

### **5.8.2. Discusión de los resultados obtenidos en el estudio de la detección de Aflatoxinas en los tapones inoculados experimentalmente con *Penicillium citrinum*.**

En los tapones de vino tranquilo, los valores más altos de detección de aflatoxinas, a partir de tapones inoculados experimentalmente con *Penicillium citrinum*, se obtienen a los 21 días de la inoculación en la primera agitación, siendo el valor de 3 ppb. y el valor menor es de 0,2 ppb que se obtiene a los 14 días de la inoculación en la segunda agitación..

En los tapones de vino espumoso el valor más alto se obtiene a los 14 días de la inoculación en la primera agitación, siendo el valor de 0,8 ppb y el valor más bajo es de cero que se obtiene a los 21 días de la inoculación en la segunda agitación.

### **5.8.3. Discusión de los resultados obtenidos en el estudio de la detección de Aflatoxinas en los tapones inoculados experimentalmente con *Penicillium frequentans*.**

En los tapones de vino tranquilo, los valores más altos de detección de aflatoxinas, a partir de tapones inoculados experimentalmente con *Penicillium frequentans*, se obtienen a los 14 días y a los 21 días de la inoculación en las segundas agitaciones, siendo el valor de 1.1 ppb y el valor menor es de 0,7 ppb que se obtiene a los 14 días de la inoculación en la primera agitación.

En los tapones de vino espumoso los valores más altos se obtienen a los 14 días de la inoculación en la primera agitación, el valor es de 2,4 ppb mientras que el valor más bajo es de 0,9 ppb a los 21 días de la inoculación y en la segunda agitación.

### **5.8.4. Discusión de los resultados obtenidos en el estudio de la detección de Ocratoxina A en los tapones inoculados experimentalmente con *Penicillium purpurescens*.**

En los tapones de vino tranquilo, se obtienen valores de detección de Ocratoxina A en los tapones inoculados experimentalmente con *Penicillium purpurescens*, de 7,9 ppb a los 21 días de la inoculación en la primera inoculación y de 7,7 ppb a los 14 días de la inoculación en la segunda agitación, mientras que el valor menor es de 1,7 ppb que se obtiene a los 21 días de la inoculación en la segunda agitación.

En los tapones de vino espumoso el valor mayor se obtiene a los 21 días de la inoculación en la segunda agitación siendo el valor de 8,8 ppb y el valor menor es de 3,0 ppb que se obtiene a los 14 días de la inoculación en la primera agitación.

### **5.8.5. Discusión de los resultados obtenidos en el estudio de la detección de DON en tapones inoculados experimentalmente con *Fusarium moniliforme*.**

En los tapones de vino tranquilo, se obtiene el valor máximo de detección de DON en los tapones inoculados experimentalmente con *Fusarium moniliforme*, a los 7 días de la inoculación siendo la muestra triturada, el valor es de 2,7 ppm y los valores menores son de cero a los 7 días de la inoculación en la segunda agitación y en las muestras de los 21 días de la inoculación.

En los tapones de vino espumoso se obtienen valores de 0,2 ppm a los 7 días de la inoculación tanto en la primera como en la segunda agitación no detectándose a los 7 días de la inoculación en la muestra triturada ni a los 14 días de la inoculación tanto en la primera como en la segunda agitación.

En las cromatografías en capa fina realizadas a partir de muestras analizadas en los kits de Elisa se confirma la existencia de DON en las muestras cuantificadas con valores de 0,5 ppm y 0,3 ppm en los kits mientras que en las muestras no detectadas por los kits tampoco se detecta DON en las cromatografías.

#### **5.8.6. Discusión de los resultados obtenidos en el estudio de la detección de Fumonisinias en los tapones inoculados experimentalmente con *Fusarium moniliforme*.**

En los tapones de vino de vino tranquilo, se obtienen valores de detección de Fumonisinias en los tapones inoculados experimentalmente con *Fusarium moniliforme*, de 0,4 ppm a los 14 días de la inoculación en la primera y en la segunda agitación y también a los 21 días de la inoculación en la segunda agitación, el valor menor es de cero que se da a los 7 días de la inoculación en la primera agitación.

En los tapones de vino espumoso se obtienen valores de 0,5 ppm y de 0,4 ppm a los 21 días de la inoculación en la primera y en la segunda agitación, mientras que los demás valores obtenidos son cero.

En las cromatografías en capa fina realizadas a partir de muestras analizadas en los kits de Elisa se confirma la existencia de fumonisinina en las muestras cuantificadas con valores de 1,3 ppm en los kits mientras que en las muestras no detectadas por los kits tampoco se detecta fumonisinina en las cromatografías

#### **5.8.6. Discusión de los resultados obtenidos en el estudio de la detección de Zearalenona en los tapones inoculados experimentalmente con *Fusarium moniliforme*.**

En los tapones de vino tranquilo, se obtienen valores de detección de Zearalenona en los tapones inoculados experimentalmente con *Fusarium moniliforme*, de 38,9 ppb a los 21 días de la inoculación en la primera agitación y un valor de 14,3 ppb a los 7 días de la inoculación con la muestra triturada. Los restantes valores de detección son cero.

En los tapones de vino espumoso se obtiene un valor de 115,8 ppb a los 21 días de la inoculación en la segunda agitación, hay valores intermedios de 34,5 ppb a los 14 días de la inoculación en la primera agitación y valores de cero a los 7 días de la inoculación.

#### **5.8.7. Discusión de los resultados obtenidos en el estudio de la detección de Ocratoxina A, en los tapones inoculados experimentalmente con *Aspergillus ochraceus*.**

En los tapones de vino tranquilo, los valores de detección de Ocratoxina A en los tapones inoculados experimentalmente con *Aspergillus ochraceus*, más altos se obtienen a los 14 días tanto en la primera agitación como en la segunda siendo los valores de 4,5 ppb y de 4,3 ppb mientras que los valores menores son cero que se obtienen a los 7 días de la inoculación.

En los tapones de vino espumoso, los valores más altos se obtienen también a los 14 días de la inoculación en la primera agitación, siendo el valor de 2,8 ppb, mientras que los valores menores se obtienen a los 7 días de la inoculación y los valores son cero.

En las cromatografías en capa fina realizadas a partir de muestras analizadas en los *kits* de Elisa se confirma la existencia de Ocratoxina A en las muestras cuantificadas con valores de 30 ppb y 22,2 ppb en los *kits* mientras que en las muestras no detectadas por los *kits* tampoco se detecta Ocratoxina A en las cromatografías

#### **5.8.9.- Discusión de los resultados obtenidos en el estudio de la detección de Ocratoxina A en los tapones inoculados experimentalmente con *Aspergillus niger*.**

En los tapones de vino tranquilo, los valores más altos de detección de Ocratoxina A en los tapones inoculados experimentalmente con *Aspergillus niger*, se obtienen a los 14 días de la inoculación en la primera agitación siendo el valor de 1,4 ppb y el valor menor es cero que se obtiene a los 7 días de la inoculación en la segunda agitación.

En los tapones de vino espumoso el valor más alto se obtiene a los 14 días de la inoculación en la primera agitación, mientras que el valor más bajo se obtiene a los 14 días de la inoculación en la segunda agitación y a los 21 días de la inoculación en la segunda agitación siendo el valor de 0,3 ppb.

En las cromatografías en capa fina realizadas a partir de muestras analizadas en los *kits* de Elisa se confirma la existencia de aflatoxinas en las muestras cuantificadas con valores de 1.9 ppb y 0,9 ppb en los *kits* mientras que en las muestras no detectadas por los *kits* tampoco se detecta aflatoxina en las cromatografías.

## **5.9.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LAS POSIBLES MIGRACIONES DE LAS MICOTOXINAS INOCULADAS**

### **5.9.1. Discusión de los resultados obtenidos en las migraciones de AFLATOXINAS**

Para los tapones de vino tranquilo se han obtenido unos valores de recuperación de Aflatoxinas que oscilan entre 0,6 ppb y 2,4 ppb si tenemos que cuenta que se han inoculado 50  $\mu$ L de una concentración de 8 ppb, los porcentajes de recuperación varían entre el 7,5 % y el 30 % y las migraciones al vino de esta micotoxina con estos tapones ha sido nula.

Para los tapones de vino espumoso se han obtenido valores de recuperación de Aflatoxinas que oscilan entre 0,1 ppb y 0,7 ppb si tenemos en cuenta que hemos inoculado 25  $\mu$ L de una concentración de 8 ppb, los porcentajes de recuperación varían entre el 1,25% y el 8,75% mientras que las migraciones al vino de esta micotoxina en estos tapones oscila entre 0 y 0,2 ppb que en porcentaje es de 0 a 2,5%.

Si comparamos los cantidades recuperadas de los tapones con las migraciones al vino tenemos que en un tapón en que hemos recuperado 0,4 ppb el valor de migración al vino ha sido de 0,1 ppb lo que representa un porcentaje del 25% en un tapón que hemos recuperado 0,2 ppb el valor de migración al vino de esta micotoxina ha sido de 0,2 ppb lo que representa el 100% y en otro que tenemos un valor de recuperación de 0,5 ppb el valor de migración al vino ha sido de 0,1 ppb que representa un porcentaje del 20% pero cabe remarcar que hay tapones que presentan valores de recuperación superiores a los mencionados pero no hay migración al vino de esta micotoxina.

Los valores legislados de aflatoxinas totales oscilan entre 1 y 30 ng/g para productos lácteos, piensos para animales y harinas (Fuente: FAO).

### **5.9.2. Discusión de los resultados obtenidos en las migraciones de DON.**

Para los tapones de vino se han obtenido unos valores de recuperación de DON que oscilan entre 0 y 0,1 ppb si tenemos en cuenta que hemos inoculado 50 $\mu$ L de una concentración de 3 ppm los porcentajes de recuperación varían entre el 0 y el 3,33 % Cabe remarcar que la migración la vino de esta micotoxina con estos tapones ha sido nula.

Para los tapones de vino espumoso no ha habido ninguna recuperación de esta micotoxinas en los tapones inoculados y tampoco se ha detectado ninguna migración al vino.

No hay legislación específica para esta micotoxina.

### **5.9.3. Discusión de los resultados obtenidos en las migraciones de FUMONISINAS**

No ha habido ninguna recuperación de Fumonisinias en los tapones inoculados con ella y tampoco se ha detectado ninguna migración al vino.

### **5.9.4. Discusión de los resultados obtenidos en las migraciones de Ocratoxina A**

Para los tapones de vino se han obtenido unos valores de recuperación Ocratoxina A que oscilan entre 1,0 y 58,5 ppb, si tenemos en cuenta que hemos inoculado 50  $\mu$ L de una concentración de 25 ppb, los porcentajes de recuperación varían entre el 4 % y el 234 % La migración existente en el vino para esta micotoxina oscila entre 0 y 1,3 ppb lo que representa un porcentaje de 0 al 5,2 %.

Si comparamos las cantidades recuperadas en los tapones con las migraciones al vino, tenemos que en un tapón en que hemos recuperado 4,5 ppb en el vino han migrado 0,7 ppb lo que representa un porcentaje del 15,5 % en otro tapón con un valor de recuperación de 10,8 ppb la migración al vino ha sido de 1,3 ppb lo que representa un porcentaje de 12,04% y en otro tapón que hemos recuperado 1,9 ppb en el vino han migrado 0,6 ppb lo que representa un porcentaje de 31,58%.

Cabe remarcar que tapones de corcho que presentaban valores de recuperación de las micotoxinas, no dan lugar a fenómenos de migración al vino.

Para los tapones de vino espumoso se han obtenido unos valores de recuperación que oscilan entre 0,4 y 2,5 ppb, si tenemos en cuenta que hemos inoculado 25  $\mu$ L de una concentración de 25 ppb, los porcentajes de recuperación varían entre 1,6 % y el 10 % La migración existente al vino para esta micotoxina oscila entre 0 y 1,6 ppb esto representa un porcentaje de recuperación de 0 a 6,4 %.

Si comparamos las cantidades recuperadas en los tapones con las migraciones al vino tenemos que en un tapón en que hemos recuperado 1,4 ppb el valor de migración al vino ha sido de 1,6 ppb lo que representa un 114,29 %, en otro tapón en que hemos recuperado 1,4 ppb se ha detectado 1,3 ppb al vino lo que representa un porcentaje de 92,86 %, en otro tapón en que hemos recuperado 1,3 ppb el valor que ha migrado al vino ha sido de 0,3 ppb lo que representa un porcentaje de 23,08 % y en otro en que

se ha recuperado 1,3 ppb el valor de migración al vino ha sido de 0,1 ppb por lo que el porcentaje representa un 7,69% .

Al igual que en los tapones para vino, hay tapones con valores de recuperación de micotoxinas en que no se ha detectado la capacidad de migración al vino.

La legislación existente para esta micotoxina para vinos, vinos espumosos y bebidas alcohólicas es de 2 ppb.

#### **5.9.5. Discusión de los resultados obtenidos en las migraciones de T-2.**

Para los tapones de vino se han obtenido valores de recuperación de micotoxina T-2 que oscilan entre 6,7 y 51,4 ppb, si tenemos en cuenta que hemos inoculado 50  $\mu$ L de una concentración de 250 ppb los porcentajes de recuperación oscilan entre 2,68 % y 20,56 % La migración existente al vino para esta micotoxina esta comprendida entre 0 y 46,4 ppb lo que representa un porcentaje de 0 a 18,56 %.

Si comparamos las cantidades recuperadas en los tapones con las migraciones al vino, tenemos que en un tapón en que hemos recuperado 12,6 ppb los valores de migración al vino son de 46,4 ppb y de un tapón en que hemos recuperado 51,4 ppb obtenemos un valor de migración al vino de 7 ppb lo que representa un porcentaje del 13,62%

A partir de tapones de corcho, con otros valores de recuperación para micotoxina T-2, no se ha detectado migración al vino de la misma.

Para los tapones de vino espumoso de han obtenido unos valores de recuperación que oscilan entre 0 y 8,2 ppb y si tenemos en cuenta que hemos inoculado 25  $\mu$ L de una concentración de 250 ppb los porcentajes de recuperación oscilan entre 0 y 3,28% La migración existente al vino para esta micotoxina esta comprendida entre 0 y 38,2 ppb lo que representa un porcentaje de 0 al 15,28%.

Si comparamos las cantidades recuperadas en los tapones con las migraciones al vino tenemos que en un tapón en que hemos recuperado 2,5 ppb los valores de migración al vino son de 38,2 ppb. Al igual que en otros casos obtenemos tapones con otros valores de recuperación para esta micotoxina en que no se ha detectado migración al vino.

La legislación existente de T-2 oscila entre 25 y 100 ng/g para piensos y cereales.

La diferencia de resultados obtenidos en los tapones para vino tranquilo y en los tapones para vino espumoso, posiblemente tiene que ver con la inoculación realizada, ya que mientras en los tapones de vino se han realizado tres inoculaciones de 5 $\mu$ L en cada una de las caras del tapón y cuatro en el lateral del tapón, en los tapones de vino espumoso se han realizado cinco inoculaciones de 5 $\mu$ L en la arandela.



## 5.10. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA DETECCIÓN DE MICOTOXINAS EN TAPONES DE MERCADO

Los resultados obtenidos en la detección de micotoxinas en tapones de corcho para vino tranquilo y para vino espumoso de mercado permiten indicar:

- A) Para micotoxina **T-2**, los valores de detección para tapones de vino tranquilo, oscilan entre 6,4 ppb y 0 ppb, mientras que para tapones de vino espumoso oscilan entre 27,3 ppb y 3,2 ppb.
- B) Para **Aflatoxinas**, los valores de detección a partir de tapones de vino tranquilo, oscilan entre 1,4 ppb y 0 ppb, mientras que para tapones de vino espumoso oscilan entre 3,4 ppb y 0 ppb.
- C) Para **Zearalenona**, no se detectó su presencia en ninguna de las muestras analizadas.
- D) Para **Ocratoxina A A**, los valores de detección en tapones de vino de vino tranquilo, oscilan entre 4,7 ppb y 2,7 ppb mientras que para los tapones de vino espumoso oscilan entre 17,5 ppb y 0,2 ppb.
- E) Para **DON**, los valores de detección en tapones de vino tranquilo, oscilan entre 1,3 ppm y 0 ppm, mientras que para los tapones de vino espumoso oscilan entre 0,2 y 0 ppm.
- F) Para **Fumonisin**, los valores de detección en los tapones de vino tranquilo, oscilan entre 0,2 ppm y 0 ppm, mientras que para los tapones de vino espumoso oscilan entre 0,1 ppm y 0 ppm.

En el sector vinícola, la legislación regula solamente la Ocratoxina A, siendo el valor para vinos de 2 ppb, por ello se ha realizado un estudio más exhaustivo, de dicha micotoxina en tapones de mercado.

En nuestro estudio, para los tapones de vino tranquilo, los valores han oscilado entre 6,1 ppb y 0 ppb, frente a los obtenidos en los tapones de vino espumoso cuyos valores han oscilado entre 4,0 ppb y 0 ppb.

Los valores obtenidos implican que difícilmente transferirán al vino un valor superior al legislado.

### **5.11. - DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LOS VALORES MÁXIMOS OBTENIDOS EN LOS ENSAYOS DE MICOTOXINAS**

El valor máximo obtenido para Aflatoxinas en tapones inoculados es de 3 ppb, mientras que en las migraciones es de 0,2 ppb y en el estudio realizado en tapones de mercado es de 3,2 ppb.

La legislación existente limitando la presencia de Aflatoxinas en los alimentos para consumo humano fija un valor máximo de 4 ppb. Todos los valores obtenidos de Aflatoxinas a lo largo de este estudio son inferiores al valor máximo legislado.

El valor máximo obtenido para Ocratoxina A en tapones inoculados es de 8,8 ppb, en migraciones ha sido de 1,6 ppb y en tapones de mercado 4,7 ppb. La legislación existente para alimentos, específicamente en vinos es de 2 ppb.

El valor máximo para DON en tapones inoculados es de 2,7 ppm, en las migraciones fue de 0,0 y en los tapones de mercado 17,5 ppm. El valor legislado para alimentos (pan, pasteles, galletas, cereales para desayuno) es de 500 ppb.

El valor máximo para Fumonisinias en tapones inoculados fue de 0,5 ppm, no se detectó en el estudio sobre migraciones y fue de 0,2 ppm para los tapones de mercado. El valor que entrará en vigor a partir de 1 de octubre del 2007, para alimentos de consumo directo es de 400 ppb.

\_\_\_\_\_CONCLUSIONES

## 6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el desarrollo del estudio permiten aportar las conclusiones siguientes:

1. Los lavados con peróxido de hidrógeno a los que se somete el tapón natural para vino tranquilo, determinan una menor variabilidad de especies fúngicas en los mismos.
2. La presencia de *Rhodotorula glutinis* en los tapones de vino espumoso, está relacionada con la no aplicación de lavados con peróxido de hidrógeno. Asimismo se observa que existe una correlación entre la presencia o ausencia de esta levadura con la presencia o ausencia de cepas de *Rhizopus arrhizus* y/o *Mucor hiemalis*.
3. Excepto *Monilia sitophila*, las cepas fúngicas aisladas tienen una marcada capacidad inhibidora del desarrollo de otros microorganismos.
4. La actividad enzimática de las cepas fúngicas aisladas de tapones de corcho colabora e incrementa su actividad inhibidora. Asimismo ratifica la eficacia de estos microorganismos en transformar el sustrato para la elaboración de los tapones.
5. El corcho no es un sustrato que facilite la adhesión y persistencia de las cepas fúngicas, ya que los porcentajes de recuperación de cepas fúngicas a partir de las concentraciones iniciales inoculadas no superan el 0,2 %.
6. Las cepas fúngicas aisladas de muestras de tapones de corcho son capaces de elaborar y acumular micotoxinas.
7. La técnica ELISA permite detectar la presencia de micotoxinas en los tapones de corcho inoculados experimentalmente. Evaluada positivamente la técnica ELISA podemos indicar que es un método alternativo correcto para detectar la presencia de micotoxinas en el vino en contacto con corcho que contengan micotoxinas.
8. Los niveles aceptables de micotoxinas en los tapones de corcho con el fin de evitar la transferencia al vino en concentraciones peligrosas para el consumidor, deben ser fijados en base a la legislación existente para alimentos. Por ello debe limitarse a 2 ppb la concentración en Ocratoxina A y a 4 ppb la concentración máxima permitida de Aflatoxinas.
9. Consideramos imprescindible establecer una legislación en el sector corchero que limite la presencia de especies de hongos productoras de micotoxinas (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium moniliforme*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium frequentans* y *Penicillium purpureescens*).

## BIBLIOGRAFÍA

---

## 7.- BIBLIOGRAFIA

1. ADAMS M.R.; MOSS M.O. 1997 Microbiología de los alimentos. Editorial Acribia, SA España 494 pp
2. ALVAREZ-RODRIGUEZ M.L. ; BELLOCH C. ; VILLA M ; URUBURU F. ; LARRIBA G. ; RUBIO 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
3. ALVAREZ-RODRIGUEZ M.L. ; BELLOCH C. ; VILLA M ; URUBURU F. ; LARRIBA G. ; RUBIO COQUE J.J. 2003 Degradation of vanillic acid and production of guaiacol by microorganisms isolated from cork samples. FEMS microbiology letters 220 (2003) 49-55 pp
4. ANTON A.; LIZASO J. 2001 Hongos y micotoxinas. Fundación ibérica para la seguridad alimentaria.
5. ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE NORMALIZACIÓN Y CERTIFICACIÓN. 2003 Tapones de corcho. Ediciones AENOR. [URL:http://www.aenor.es](http://www.aenor.es)
6. BLANC M. 2001. Législation communautaire sur les aflatoxines. Incidences sur le commerce de l'arachide de bouche et de la pistache. Revue alimentation et nutrition de la FAO.
7. BU'LOCK J.D. 1965. Aspects of secondary metabolism in fungi. En Biogénesis of antibiotic substances Vanek Z y Hostales Z. Academia Press USA 61-71
8. BURROUGHS R., SUTZ M., SAUER D.B., MOHR H.E. 1976 Effects of substrate on metabolite production by *Alternaria alternata*. Applied and Environmental microbiology 31 (5): 685-690
9. CASTERA-ROSSIGNOL, A 1983 Contrôle microbiologique des bouchons. Bouchons stériles, conditions de conservation des bouchons. Con. Vigne Vin, 17(3) : 183-193
10. CALVO M<sup>a</sup>. A.; LARRONDO J. ; AGUT M. 1993 Microbiología de los tapones de corcho. AECORK NEWS12 18-19

11. CALVO M<sup>a</sup> A.; 2001. Aspectos de la contaminación microbiológica en la industria de los piensos.
12. CALVO M<sup>a</sup>.A. 2005 Calidad microbiológica del corcho. Congrés internacional sureres, fabriques i comerciants. Palafrugell febrer 2005.
13. CANALSALUD. 2000. Salud alimentaria. Los riesgos de la humedad en los alimentos  
URL:[http://www.mejorprevenir.com/salud\\_alimentaria/actualidad/XVIII2000.htm](http://www.mejorprevenir.com/salud_alimentaria/actualidad/XVIII2000.htm)
14. CANALSALUD. 2001. Salud alimentaria. Higiene y sanidad en los alimentos.  
URL:[http://www.mejorprevenir.com/salud\\_alimentaria/riesgos/micotoxinas.htm](http://www.mejorprevenir.com/salud_alimentaria/riesgos/micotoxinas.htm)
15. CENTENO BRICEÑO, S. 2001 Evaluación de la calidad microbiológica de tapones de corcho para vinos elaborados en Cataluña. Tesis doctoral. Fac. Ciencias Universidad Autónoma de Barcelona.
16. CENTENO S. ; CALVO M.A. 2001. Enzymatic activity of micro-organisms isolated from cork wine stoppers. *Microbios* 106: 69-73
17. CHATONNET P. 2001 comunicación personal. [Lab\\_excell@compuserve.com](mailto:Lab_excell@compuserve.com)
18. CHRISTOV L.P.; PRIOR B.A.1993. Esterases of xylan-degrading microorganisms: Production, properties, and significance. *Enzyme and Microbial technology* 15: 460-475
19. CODINA J., ESTEBAN C., CALVO MA., AGUT M. 1993 Influence of microorganisms in case of cork taint *Industrie delle Bevande*, 22: 561-563
20. COLAGRANDE O. 1996 Problems relative to the use of cork in bottle closures. *Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Symposium on cork Italy* 3-10
21. COLAGRANDE O. 1996 Il tappo di sughero. Preparazione-Lavorazione-Utilizzo in *Enología*. Chiriotti Editori Italia. 159 pp
22. COMMISSION EUROPÉENNE. Direction générale "santé et protection des consommateurs. 2000. Rapports finaux d'études scientifiques sur l'utilisation de liants anti-mycotoxines.

23. CONGRES INTERNACIONAL SURERES, FÀBRIQUES I COMERCIANTS Passat, present i futur del negoci surer. 2005 Palafrugell.
24. CONGRESSO MUNDIAL DO SOBREIRO E DA CORTIÇA. 2000. Lisboa.
25. DAILY NM, LEE T.H., FLEET GH. 1984 Growth of fungi on wine corks ad its contribution to cork taints in wine. Food Techn. Aus, 36: 22-24
26. DANESH P., CALDAS FM.; FIGUEREIDO J.J.; SAN ROMAO MV. 1997 Mycobiota in Portuguese “normal” and “green” cork throughout the manufacturing process of stoppers, J. Applied Microbiology; 82: 689-694
27. DASS M.K.L. ; PRASAD J.S. ; AHMAD S.K. 1997. Endoglucanase production by paper-degrading mycoflora. Letters in Applied Microbiology 25: 313-315
28. DEMAIN A.L., PIRET J.M. 1981 Why secondary metabolism? En “microbiology” Ed. D. Schlesinger American Society for microbiology USA 363-366
29. DIARIO OFICIAL DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS. 2001. Reglamento (CE) nº 466/2001 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. Diario oficial nº L077 de 16/03/2001 p. 0001-0013. URL:[http://www.europa.eu.int/eur\\_lex](http://www.europa.eu.int/eur_lex)
30. DIARIO OFICIAL DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS. 2002. Reglamento (CE) nº 472/2002 que modifica el Reglamento (CE) nº 466/2001 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. Diario oficial nº L75/18 de 16/03/2002
31. DIARIO OFICIAL DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS. 2003. Reglamento (CE) nº 2174/2003 que modifica el Reglamento (CE) nº 466/2001 por lo que respecta a las aflatoxinas. Diario oficial nº L326/12 de 13/12/2003
32. DIARIO OFICIAL DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS. 2004. Reglamento (CE) nº 683/2004 que modifica el reglamento (CE) nº 466/2001 por lo que respecta a las aflatoxinas y a la Ocratoxina A A en los alimentos destinados a lactantes y niños de corta edad. Diario oficial nº L106/3 de 13/04/2004



33. DIARIO OFICIAL DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS. 2005. Reglamento (CE) n° 123/2005 por el que se modifica el Reglamento (CE) n° 466/2001 con respecto a la Ocratoxina A A. Diario oficial n° L25/3 de 26/01/2005
34. DIARIO OFICIAL DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS. 2005. Reglamento (CE) n° 856/2005 por el que se modifica el Reglamento (CE) n° 466/2001 en lo que se refiere a las toxinas de *Fusarium*. Diario oficial n° L143/3 de 06/06/2005
35. DOMSCH K.H. ; GRAMS W. , ANDERSON T.H. 1980 Compendium of soil fungi. Academic Press. USA 859 pp
36. DUCAR P., MORENO B. 1991. El sistema de análisis de riesgos y puntos críticos. Su aplicación a las industrias de alimentos. Editorial Acribia, SA España. 332 pp
37. DUMOULIN M. ; RIBOULET J.M. 2004 Réflexions sur la présence d'ochratoxine A dans les vins et les jus de raisin. Revue des œnologues n° 104
38. EUROPEAN COMMISSION. Scientific committee on food. 2002. Opinion of the scientific committee on food on *Fusarium* toxins. Part 6: group evaluation of T-2 toxin, HT-2 toxin, nivalenol and deoxynivalenol. 1-12 pp
39. EUROPEAN COMMISSION. Scientific committee on food. 2001. Opinion of the scientific committee on food on *Fusarium* toxins Part 5: T-2 toxin and HT-Toxin. 1-25 pp.
40. EUROPEAN COMMISSION. Scientific committee on food. 2000. Opinion of the scientific committee on food on *Fusarium* toxins part 3: Fumonisin B1 1-33 pp
41. EUROPEAN COMMISSION. Scientific committee on food. 2000. Opinion of the scientific committee on food on *Fusarium* toxins Part 2: zearalenone 1-12 pp
42. EUROPEAN COMMISSION. Scientific committee on food. 1999. Opinion on *Fusarium* toxins. Part 1: Deoxynivalenol
43. EUROPEAN COMMISSION. SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD. 1998. Opinion of the scientific committee on food on ochratoxin A 1-8 pp

44. FABREGA A.; AGUT M.; CALVO M.A. 2002. Optimization of the method of detection of metabolites produced by the *Alternaria* genus: alternariol. Alternariol monomethyl ether, altenuene , altertoxin I and tentoxin. Journal of food science 67(2):
45. FALCO G., SAMPO S.; 1993 Influence of preventive mycological and organoleptical controls on the raw cork quality. Industries delle Bevande,22 549-550
46. FAO 1997 Worldwide regulations for mycotoxins 1995 Fao Food and Nutrition paper 64. URL:<http://www.fao.org>
47. FAO/OMS/PMA 1998 Tercera conferencia internacional sobre micotoxinas, Túnez 3-6 marzo
48. FAO/OMS/PNUMA 1999 Tercera conferencia internacional mixta sobre micotoxinas Túnez 3-6 marzo.
49. FAO/WHO Expert committee on food additives 2001. Fifty-sixth meeting. Summary and conclusions. Geneva 6-15 February 2001. 1-33 pp
50. FAO/WHO Expert Committee on food additives 2002 Fifty-sixth report. Evaluation of certain mycotoxins in food.
51. FAO CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION 2002. Codex committee on food additives and contaminants thirty-four sessions. Discussion paper on deoxynivalenol. Rotterdam, The Nederland, 11-15 march 2002
52. FAO. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION 2000. Codex committee on food additives and contaminants thirty-second session. Position paper on fumonisins Beijing Republic of China 20.24 march 2000
53. FERREIRA M ; GIL L 1999 Cortiça guia normativo CTCOR Portugal 85 pp.
54. FONSECA H. 2001. Micotoxinas on line. URL: <http://www.micotoxinas.com.br>
55. FIRST BOTANY 135. EXAM 2001. Mycotoxins. URL: <http://www.botany.hawaii.edu/facultu/wong/bot135/lect11.htm>

56. GERMAN FEDERAL MINISTRY OF FOOD, AGRICULTURE AND FORESTRY. Federal Agricultural Research Institute. 2000. Risk factors for *Fusarium* toxin formation in animal feeds, and avoidance strategies in feed production and feeding. 1-61 pp.
57. GIMENO A. ; MARTINS M.L. 1988. Métodos de análisis de micotoxinas en piensos compuestos y materias primas. (rev.1) Conferencia – Salón de fabricantes de piensos del Mediterráneo. Reus. España.
58. GIMENO A. MARTINS M.L. 2000. Residuos de micotoxinas en alimentos de origen animal. (leche, huevos, carne) (rev.1) Revista veterinaria ALBEITAR nº 36 y 37
59. GIMENO A. MARTINS M.L. 2000. Reglamentaciones para algunas micotoxinas en la alimentación animal y humana. Revista veterinaria ALBEITAR nº 40
60. GIMENO A. 2002. Los hongos y las micotoxinas en la alimentación animal. URL: <http://www.engormix.com/nuevo/prueba/micotoxinas1.asp?valor=76>
61. GIRALT J.; JAVIERRE J.A. ; PIÑOL J. ; RAMALLO T. 1989. El problema de la contaminación fúngica en la industria de piensos. División de zootecnia. Lucta SA
62. GONZALEZ ADRADOS J.R. ; CALVO HARO R.M. 1994 Variación de la humedad de equilibrio del corcho en plancha con la humedad relativa. Modelos de regresión no lineal para las isotermas de adsorción. INIA. Investigación agraria. Sistemas y recursos forestales 3 (2):199-209
63. HERMOSIN L. 2002. Los tapones para botellas de vino: eficacia de cierre, control de calidad sensorial y microbiológica y relación con el defecto de “gusto a corcho” del vino. Área tecnológica de alimentos EUJT Agrícola. Universidad de Castilla-La Mancha. Ciudad Real.
64. INSTITUT CATALA DEL SURO. 1993. N.C.S. 011/93 Taps de suro aglomerat per a vins escumosos. URL: <http://www.icsuro.com>
65. INSTITUT CATALA DEL SURO. 1993. N.C.S. 012/93 Taps de suro aglomerat per a vins tranquils.

66. INSTITUT CATALA DEL SURO. 1994. N.C.S. 021/94 Taps de suro natural semielaborats per a vins tranquils.
67. INSTITUT CATALA DEL SURO. 1994. N.C.S. 022/94 Discs de suro natural per a vins escumosos.
68. INSTITUT CATALA DEL SURO. 1995. N.C.S. 010/95 Taps de suro aglomerat amb discs de suro natural per a vins escumosos.
69. INSTITUT CATALA DEL SURO. 1995. N.C.S. 020/95 Taps de suro natural per a vins tranquils.
70. INSTITUT CATALA DEL SURO. 1996. N.C.S. 023/96 Tapones de corcho colmatados para vinos tranquilos. Métodos de ensayo y especificaciones.
71. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION 2002. ISO 10718:2002 Corks stoppers- Enumeration of colony-forming units of yeasts, moulds and bacteria capable of growth in an alcoholic medium.  
URL:<http://www.iso.org>
72. ISTITUTO DI ENOLOGIA – PIACENZA ITALIA. 1993. Il sughero in enologia. Chiriotti editori.
73. ISTITUTO DI ENOLOGIA- PIACENZA ITALIA 1996. 2 simposio internazionale sul sughero. Chiriotti editori.
74. JACOBSEN B.J. ; BOWEN K.L. ; SHELBY R.A. ; DIENER U.L. KEMPPAINEN B.W. ; FLOYD J. Mycotoxins and micotoxicoses. Circular-767 (02/93) Alabama A&M and Auburn Iniversities.1-11 pp
75. JIEHUA Y.; OWEN P. W. (1994) Studies on factors influencing the biodegradation of pentachlorophenol by a mixed bacterial culture. International biodeterioration & biodegradation : 209-221
76. JUANOLA R. 2002. Estudi de la presència de cloroanisoles en les etapes del procés de producció de la indústria de taps de suro. Influència en les desviacions sensorials de vins tranquils i escumosos. Tesi doctoral. Facultat de Ciències de la universitat de Girona.

77. LEFEBVRE A.; RIBOULET J.M., BOIDRON J.N., RIBÉRAUD-GAYON P. 1983 Incidence des micro-organismes du liège sur les altérations olfactives du vin. *Sc. Alimet*, 3 : 265-278
78. MARTI M.C. ; ALONSO R.M. ; CONSTANS A. NTP351 Micotoxinas (aflatoxinas y tricotecenos) en ambientes laborales. Ministerio de trabajo y Asuntos sociales. URL:[http://www.mtas.es/INSHT/ntp/ntp\\_351.htm](http://www.mtas.es/INSHT/ntp/ntp_351.htm)
79. McDERMID K.P. ; MacKRNZIE C.R.; FORSBERG C.W. 1997. Esterase activities of *Fibrobacter succinogenes* subs. *succinogenes* S85. *Applied and Environmental Microbiology* 56 (1): 127-132
80. MED SPAIN. 2000. Los riesgos de la humedad en los alimentos URL:[http://www.medspain.es/ant/n13\\_jun00/humedad.htm](http://www.medspain.es/ant/n13_jun00/humedad.htm)
81. MOLINAS M. OLIVA M. 1990. El suro i les seves classes. L'estoig Publicació del arxiu i museo de Palafrugell 2: 31-44.
82. MOREAU M., MOREAU C. , LE BRAS M.A. 1976 Quelques moisissures responsables d'altérations des bouchons de champagne. *Industries Alimentaires et agricoles*, 93(3) : 3137-3120
83. MOREAU M. 1977 Altérations des bouchons par quelques moisissures, *Rev. Fr. Oenol.*, 66 : 63-67
84. MOREAU M. 1978 La Mycoflore des bouchons de liège, *Rev. Mycol*, 42 : 155-189
85. MOREAU M. 1978 Les moisissures des bouchons, *C. R. Acad. Agric.* 68(10) :842-849
86. MOSSEL D.A.D, CORRY J.E.L. ; STUIJKC.B. BAIRD R.M. 1995 *Essentials of the microbiology on food* John Vuiley& Sons USA
87. MOSS M.O. 1994 Hongos micotoxigénicos En “Intoxicaciones alimentarias” Aley A.R. Editorial Acribia, SA España 81-101

88. NAVASCUES LÓPEZ-CORDÓN E. 1998 Origen y presencia en vinos alterados de compuestos organoclorados relacionados con el metabolismo microbiano. Tesis Doctoral, Fac. CC. Biológicas Universidad Complutense de Madrid. Inédito.
89. PARÉS R.; JUARES A. 1997 Bioquímica de los microorganismos. Editorial Reverté S.A. España 380 pp
90. PASCUAL MR. 1982 Técnicas para el análisis microbiológico de alimentos y bebidas del centro nacional de alimentación y nutrición. Ministerio de Sanidad y Consumo. 311 pp.
91. PEDRAZA-REYES M.; GUTIÉRREZ-CORONA F. 1997. The difunctional enzyme chitosanase-cellulase produced by the gram-negative microorganism. *Myxobacter* sp A1-1 is highly similar to *Bacillus subtilis* endoglucanases. Archives of microbiological degradation 168: 321-327
92. PERAICA M. ; RADIC B. ; LUCIC A. ; PAVLOVIC M. 1999. Efectos tóxicos de las micotoxinas en el ser humano. Bulletin of the world health organization 77 (9): 754-766
93. PI M. 1997. Estudi microbiològic de taps de suro natural per a vi tranquil. Treball experimental del Programa de tercer cicle de Microbiologia. Departament de Genètica y Microbiologia. Universitat Autònoma de Barcelona
94. PI M.; AGUT M, CALVO M.A. 1996. Hazard analysis and critical control points (HACCP) in flown chart of the manufacturing of semi-elaborated cork stoppers. Proceedings of the 2<sup>Nd</sup> International Symposium on Cork. Italia. 145-146
95. PI M.; ADELANTADO C.; CALVO M.A. 2005. Detection of mycotoxins in corks. Suberwood2005. Universidad de Huelva, 152-153
96. PI M.; ADELANTADO C.; CALVO M.A. 2005. Positive aspects of the microorganisms isolated form cork. Suberwood2005. Universidad de Huelva 160-161
97. PLA CASADEVALL P. 1976 El suro. Què és. Per què serveix. Editorial de la Universitat Politècnica de Barcelona. 388 pp
98. PROYECTO LEOSUBER 1999. Manual didáctico del taponero. Junta de Extremadura, IPROCOR FUNDECYT 199pp.

99. RATLEDGE C. (Editor) .1994. Biochemistry of microbiological degradation. Kluwer Academia Publishers. Holanda 590 pp.
100. RIBOULET J.M ; ALEGOET CH. 1987 Aspectos prácticos del taponado de los vinos. Bourgogne publications Francia, 290 pp
101. ROUSSEAU J. ; BLATEYRON L. 2004 Ochratoxine A dans les vins : pas de solution curative sur vin, priorité à la maîtrise sanitaire au vignoble. Revue des œnologues n° 104
102. RUBIO COQUE J.J. ; ALVAREZ-RODRIGUEZ M.L. ; LARRIBA G; 2003 Characterization o fan inducible chorophenol o.methyltransferase from *Trichoderma longibrachiatum* involved in the formation of chloroanisoles and determination of its role in cork taint of wines. Applied and Environmental Microbiology 69(9) :5089-5095
103. SAMSON R.A. ; HOEKSTRA E.S. ; OORSCHOT C.A.A. 1984 Introduction food-borne fungi. CBS Netherlands
104. SAXENA J.; MUNIMBAZI C.; BULLERMAN L.B. 2001 Relationship of mould count, ergosterol and ochratoxin A production. International journal of food microbiology 71: 29-34
105. SCHAEFFER A, MEYER J.P, GUILLERM A. 1982 Étude sur l'origine du "gout de bouchon" dans les vins Rev. Fr. Oenol. 70 : 25-29
106. SEMINAIRE SECURITÉ DES ALIMENTS 2001 Les mycotoxines. Agropolis international Montpellier.
107. SIMON M. SHANE. Mycotoxins – Problems and solutions. URL: <http://mycotoxin.com/mycotoxin/doc4/index.htm>
108. SMITH J.E., HACKING A. 1983 Fungal toxicity En " The filamentous fungi Fungal technology" (vol. 4) Eduard Arnold Publishers Gran Bretaña 239-265
109. STERNBERG D. 1976. Beta-glucosidase of *Trichoderma*: its biosynthesis and role in saccharification of cellulose. Applied and Environmental Microbiology 31: 648-654

110. SUÁREZ J.A. ; NAVASCUÉS E. ; CALDERÓN F. ; VILA J. ; COLOMO B.; GARCIA-VALLEJO C. 1997. Présence de champignon et concentration de choroanisoles pendant le processus de fabrication des bouchons de liège pour l'embouteillage des vins. Bulletin de l'O.I.V. 70: 235-245
111. SWEENEY M.J, DOBSON A.D.W 1998 Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species International Journal of food microbiology 43 141-158
112. SWEENEY M.J. ; DOBSON A.D.W. 1999 Molecular biology of mycotoxins biosynthesis. FEMS Microbiology letters 175: 149-163
113. UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAME INTERNATIONAL LABOUR ORGANISATION WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2000. International programme on chemical safety. Environmental health criteria 219 1-115 pp.
114. USDA The peoples department. Grain fungal diseases & mycotoxins reference. 1-54 pp.
115. U.S. FOOD.AND DRUG ADMINISTRATION. 2000. Draft background paper in support of fumonisin levels in animal feed. Draft Guidance for industry: Fumonisin Levels in Human foods and animal feeds.1-26 pp
116. U.S.FOOD AND DRUG ADMINISTRATION 2000. Draft background paper in support of fumonisin levels in corn and corn products intended for human consumption. Draft guidance for industry: fumonisin levels in human foods and animal feeds. 1-8 pp.
117. U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION 200. Guidance for industry fumonisin levels in human foods and animal feeds.1-4pp
118. VISCONTI A. 2000. Mycotoxicology newsletter. An international forum for mycotoxins. URL: <http://www.mycotoxicology.org>
119. VON DER BECKE C. 1999. Actividad acuosa. URL: [http://www.argenet.com.ar/\\_von/adobleve.html](http://www.argenet.com.ar/_von/adobleve.html)



120. YONG R.K.; COUSIN M.A. 2000. Detection of moulds producing aflatoxins in maize and peanuts by an immunoassay. *International journal of food microbiology*. 65.:27-38
  
121. ZIMMERLI B.; DICK R. 1996 Ochratoxin A in table wine and grape-juice. Occurrence and risk assessment. *Food Additives and Contaminants* 13 (6): 665-668