

55
2º



Universidad Nacional Autónoma
de México

FACULTAD DE CIENCIAS

"MICROBIOLOGIA Y BIOQUIMICA
DE LOS QUESOS MADURADOS POR
HONGOS DEL GENERO PENICILLIUM"

TESIS

Que para obtener el Título de:

BIOLOGO

Presenta:

Alejandro Díaz Torres



1996 FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS

COMPLETA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Microbiología y bioquímica de los quesos madurados por hongos del género Penicillium"

realizado por Alejandro Díaz Torres

con número de cuenta 8453207-5 **, pasante de la carrera de** Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis	Dr. Alvaro Argaiz Jamet
Propietario	
Propietario	M. EN C. Joaquín Cifuentes Blanco
Propietario	Dr. Miguel Ulloa Sosa
Suplente	M. en C. Ana Adela Sánchez Mendoza
Suplente	M. en C. José Luis Villarruel Ordaz

Alvaro Argaiz

Miguel Ulloa Sosa

Ana Adela Sánchez Mendoza

Consejo Departamental de Biología

[Firma]

ÍNDICE

I.- INTRODUCCIÓN

1. Antecedentes históricos
2. Clasificación de los quesos
3. La leche: materia prima de los quesos
4. Secuencia generalizada de la elaboración de los quesos

II.- PROCESO DE MADURACIÓN DE LOS QUESOS

1. Quesos madurados por bacterias y levaduras
2. Quesos madurados por hongos

III.- CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE LAS DOS PRINCIPALES ESPECIES DE Penicillium INVOLUCRADAS EN LA MADURACIÓN DE LOS QUESOS

1. Métodos de obtención de esporas de P. roquefortii Thom y P. camembertii Thom
 - a. Producción en gran escala de esporas de P. camembertii
 - b. Producción de esporas de P. roquefortii

IV.- QUESOS MADURADOS POR P. roquefortii y P. camembertii Y SU PROCESO DE ELABORACIÓN

1. Quesos de vena azul
2. Quesos suaves o de maduración superficial

V.- SECUENCIA DE CAMBIOS MICROBIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DURANTE LA MADURACIÓN DE LOS QUESOS MADURADOS POR HONGOS

1. Secuencia microbiológica.
2. Proteólisis y degradación de los aminoácidos
 - a. Intensidad de la proteólisis
 - b. Proteólisis de origen no fúngico
 - c. Efecto de Penicillium en la proteólisis
 - i) Propiedades de las proteinasas
 - ii) Acción de las proteinasas en los quesos
 - iii) Propiedades de las peptidasas.
 - d. Catabolismo de los aminoácidos
3. Lipólisis.
 - a. Grado de lipólisis
 - b. Propiedades y efectos de las lipasas de Penicillium
 - c. Ácidos grasos y su conversión a metil-cetonas
4. Degradación de la lactosa y contenido de ácido láctico

VI.- RELACIÓN DE LOS COMPUESTOS FORMADOS DURANTE LA MADURACIÓN CON LAS CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DEL QUESO.

1. Ácidos grasos libres
2. Metil-cetonas
3. Alcoholes secundarios
4. Proteínas
5. Péptidos
6. Aminoácidos
7. Amoníaco y aminas
8. Aldehidos y alcoholes
9. Compuestos sulfurados y fenoles
10. Pirazinas

VII.- PROBLEMAS MICROBIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DURANTE Y DESPUÉS DE LA MADURACIÓN

1. Problemas microbiológicos
2. Problemas bioquímicos - micotoxinas

BIBLIOGRAFIA

APENDICES

I. INTRODUCCIÓN

Los hongos han tenido un papel notable en su relación con el hombre desde sus inicios. Así, podemos hablar de los hongos como agentes de enfermedades, tanto en el hombre, los animales y las plantas, como contaminantes de granos y semillas durante su almacenamiento, y también como productores de sustancias nocivas conocidas como micotoxinas, especialmente importantes en los alimentos. Pero así también se puede considerar su particular papel en la producción de sustancias benéficas, tales como fármacos, como la penicilina y la ergotina; sustancias como el etanol, el ácido acético o el ácido cítrico, así como un número difícilmente determinable de enzimas útiles. El conocimiento de estas capacidades de los hongos y de su utilización ha significado avances en varios campos, uno de los cuales es la alimentación.

Este trabajo trata del conjunto de acciones que llevan a cabo casi en su totalidad dos especies fúngicas, que dan lugar a una gama completa de los derivados lácteos: los quesos madurados por hongos.

1. Antecedentes históricos

La leche es un producto que ha sido utilizado desde tiempos muy antiguos, y a pesar de que no se conoce con exactitud cuándo el hombre primitivo domesticó a la vaca, la cabra u otro animal para la producción de leche, existen evidencias arqueológicas en el desierto libio, de vacas que eran dedicadas a este fin y que datan de 9,000 A.C.¹ Muy probablemente, en leche sobrante o no inmediatamente utilizada, ocurrió de manera natural la precipitación de la caseína (principal proteína de la leche), formando lo que se conoce como cuajo, y sin duda se observó que en algunos casos el cuajo formado tenía olor y sabor agradables, de características suavemente ácidas, mientras que en otros casos, la leche se volvía putrefacta y causaba enfermedad si era consumida.²

Por otro lado, entre las civilizaciones antiguas era una práctica común el almacenar agua en pieles de animales, y usaban especialmente la piel estomacal. Sin duda, la leche fue almacenada en forma similar. Cuando las enzimas estomacales, especialmente la renina, es decir quimosina y pepsina, actuaban en combinación con la flora bacteriana natural de la leche, se formaba un cuajo.³

Ya en algunos libros bíblicos del Antiguo Testamento, se hacen referencias del queso como alimento; por lo tanto, en algún tiempo entre la domesticación de la vaca y otros animales, alrededor de 9,000 A.C. y los primeros tiempos bíblicos, 5,000 a 3,000 A.C.,³ se desarrollaron los procedimientos de elaboración de los quesos.

Desde entonces, el queso ha tenido un lugar importante en todas las civilizaciones importantes del mundo. Como ejemplos se pueden citar los siguientes: algunos escritos de oriente de 2,000 A.C. citan al queso como un alimento altamente apreciado y que era utilizado frecuentemente como medio de intercambio por otros artículos. Los griegos pensaban que el queso tenía un origen divino y lo ofrecían en sacrificio a sus dioses. Los romanos fueron muy diestros en la elaboración de quesos y favorecieron a un queso en especial, hecho en la isla de Chipre, como una delicadeza. Algunos soldados en los primeros siglos cristianos y a lo largo de los tiempos de Genkis Khan llevaban quesos consigo como provisiones. Posteriormente, en el tiempo de las Cruzadas, entre los

siglos XI y XIII, el queso era un alimento ya bien establecido en todo el Oriente. Así, al regresar los cruzados a Europa, trajeron consigo quesos de varios tipos, así como la información para su elaboración.⁴

Durante la Edad Media se elaboraban en Europa una considerable variedad de quesos, entre los que ya figuraban el Roquefort, el Suizo, el Gouda y el Sapsago, todos ellos bajo la protección de la Iglesia. De esta herencia provienen también quesos tales como el Port du Salut, el Trappist y el Oka.

En el caso de América del Norte, los quesos fueron introducidos por los primeros colonizadores ingleses. Tanto el Cheddar como el Cottage eran de tipo casero y se elaboraban además muchas otras variedades, especialmente en Wisconsin, por inmigrantes que gustaban todavía de variedades europeas.⁴

México, por su parte, conoció los quesos con la llegada de los colonizadores de España. En nuestros días, en este país, los quesos no madurados comprenden más de un 90% del total de la producción nacional, principalmente los tipos fresco y Oaxaca.

Actualmente el queso es considerado como el grupo de productos lácteos más diverso, complejo e interesante desde el punto de vista científico, y se producen más de 10⁷ toneladas de 500 variedades en todo el mundo.⁵

2. Clasificación de los quesos

En cuanto a la manera de clasificar los quesos, se pueden usar varios factores como base, por lo que en muchas ocasiones ésta varía dependiendo del autor que haga la referencia. Quizás la clasificación más usual es aquella que toma como base la textura o grado de dureza alcanzado después de la maduración⁶ (Fig. 1).

Según Fox,⁷ existen en todo el mundo 500 variedades de queso, que pueden ser clasificadas en 20 familias y pueden dividirse además en tres grandes grupos, basándose en el método de coagulación, que puede ser enzimática (renina), isoelectrica (ácida) o una combinación de calor y ácido. Tomando en cuenta esta división, es importante hacer notar que la mayoría de los quesos, y probablemente todas las variedades de quesos madurados se producen mediante coagulación por renina, mientras que la mayoría de los quesos frescos se producen por coagulación ácida o calor-ácido.⁷

Kosikowski (1982)⁸ cita además otra clasificación que separa a los quesos en cuatro grupos, basándose en los niveles de humedad:

- a) Humedad muy alta (80 - 55%): Cottage, Ricotta, Impastata, Neufchatel, Crema.
- b) Humedad alta: (55 - 45%): Mozzarella, Camembert, Brie, Pizza, Azul.
- c) Humedad media (45 - 34%): Edam, Brick, Suizo, Cheddar, Provolone.
- d) Humedad baja (34 - 13%): Romano, Parmesano, Ricotta seco, Gjetost, Mysost.

Pero aún Kosikowski reconoce que esta clasificación es poco apropiada porque da poca información del queso mismo, ya que la humedad absoluta - sin consideración de la temperatura y la humedad relativa a la que el queso es expuesto - tiene poca relación con las propiedades finales del queso.

Otro criterio es la edad; tomando como base este criterio se encuentra la dificultad de situar algunos quesos, como p.e. Cheddar, Suizo y Asiago, ya que se pueden consumir entre los 2 y 24 meses. En cuanto a los agentes de maduración, se puede decir que pueden dar una idea más completa del queso, pero tan sólo unos pocos quesos (Roquefort, Camembert, Brick, Suizo) se pueden caracterizar por agentes de maduración distintivos. De hecho se discute que las bacterias endógenas y los cultivos bacterianos lácteos agregados son tan importantes en la transformación del queso como

los organismos especiales. Finalmente, se puede argumentar que en la clasificación basada en la reología, es decir, la dureza o suavidad de un cuerpo, no se usan mediciones objetivas. Por lo tanto, se deduce que existe la necesidad de establecer mejores medios de clasificación básica y universal.⁸

3. La leche: materia prima de los quesos

La leche es la secreción natural de las glándulas mamarias del grupo de animales llamados mamíferos con base en esta característica. La leche comienza a fluir poco después del nacimiento de la cría y continúa durante el período de lactancia propio de cada especie⁹. En el caso de los animales domesticados el proceso es modificado por el hombre, como p.e. el ganado vacuno, en el que las crías son destetadas poco tiempo después del nacimiento y la leche producida es utilizada para el consumo humano.⁹ En el mundo occidental, la mayor parte de la leche proviene de vacas y una proporción mucho menor de animales que prevalecen en áreas específicas, como son las ovejas, las cabras y los búfalos de agua.¹⁰

La leche es un fluido complejo y de composición heterogénea, que contiene más de 100 constituyentes identificados y que consiste en una emulsión de aceite en agua, la cual está estabilizada por fosfolípidos y proteínas, adsorbidos en la superficie de los glóbulos de grasa. También contiene vitaminas hidrosolubles del grupo B: tiamina (B1), riboflavina (B2), piridoxina (B6), niacina, ácido pantoténico, biotina y ácido fólico, vitamina C, vitaminas liposolubles (A, D, E, K), sales, citratos, enzimas y el carbohidrato lactosa¹¹, y su contenido de agua promedio es de 87%.

La caseína, que es la proteína predominante en la leche de vaca - aprox. 2.5-3.5% en peso (Tabla 1), es una mezcla coloidal de fosfoproteínas, que precipitan a temperatura ambiente al punto isoeléctrico de 4.6. Cuando la renina actúa sobre ella, la molécula original se divide en dos moléculas de paracaseína, las que reaccionan inmediatamente con el Ca^{++} presente para formar un coágulo suave.¹² En la práctica común de elaboración de quesos, después de que la caseína ha sido separada, se procede a coagular la lactoalbúmina y la globulina mediante la ebullición del suero sobrante. La albúmina es utilizada para la preparación de quesos de suero, como el Ricotta, Primost, Gjetost, Mascaron y Schottenziger. La lactoalbúmina y la globulina del suero son estables ante tratamientos ácidos y térmicos.

Los constituyentes nitrogenados no proteicos incluyen amoníaco, aminoácidos, urea, purinas, pirimidinas y ácido hipúrico en los límites de 0.1 a 0.01%. Existe una cantidad suficiente de constituyentes no proteicos para permitir el crecimiento indefinido de especies bacterianas tales como las ácidos lácticas, las cuales no elaboran enzimas proteolíticas.¹³

Casi toda la fracción grasa de la leche consiste en una mezcla de triglicéridos. Los esteroides, carotenoides, vitaminas A, D y E constituyen menos del 5% en peso de la leche. Los ácidos grasos de los triglicéridos varían en tamaño desde 4 a más de 20 átomos de carbono. Menos del 2.5 % de los ácidos tienen cadenas ramificadas. Los ácidos grasos son sintetizados a partir de ácido acético, el cual a su vez es producido en el rumen a través de fermentación bacteriana. El ácido palmítico¹⁴ y el esteárico son los que se presentan en una mayor proporción entre los ácidos grasos, ya que constituyen casi un 40% del contenido total, mientras que los ácidos oléico y vacénico, que poseen un enlace insaturado, constituyen cerca del 30%. También están presentes en orden descendente de importancia los ácidos caproico y cáprico, así como algunos ácidos caprílicos¹³. Este grupo de ácidos grasos de bajo peso molecular, junto con el ácido butírico, equivalen aproximadamente al 9% en peso de la grasa de la leche.¹⁵

Una pequeña proporción de ácidos grasos tiene especial interés por estar relacionados directamente con cierto tipo de sabores, tanto de la leche en sí como de sus productos. Este grupo se

caracteriza por tener de dos a cinco enlaces dobles, y estos sitios de enlace son un fácil punto de ataque por bacterias, que causan la ruptura de los ácidos grasos, dando así lugar a moléculas pequeñas que contribuyen en gran medida al sabor característico de varios tipos de queso.¹⁶ Asimismo, estos enlaces son fácilmente oxidados produciendo peróxidos, que son responsables en gran medida de un sabor rancio (oxidado).¹⁶

La lactosa, el azúcar principal de la leche, es un disacárido β -D-galactopiranosil-1:4- β -D-glucopiranososa, que puede ser fermentada por estreptococos y lactobacilos hasta ácido láctico; sin embargo, durante la elaboración de los quesos, es relativamente pequeña la proporción de lactosa que se fermenta y la mayor parte del azúcar sigue presente en el suero. La lactosa produce algunos problemas intestinales a gente no acostumbrada a consumir leche y esta intolerancia está muy difundida en países en desarrollo. Por tal motivo, la leche que es enviada a estos países en programas de asistencia es tratada primeramente con la enzima lactasa que se obtiene de levaduras, para degradar la lactosa en sus monosacáridos constituyentes.¹⁶

En la leche cruda, la variedad de organismos que se pueden desarrollar depende de la introducción directa de microorganismos, las condiciones sanitarias, la temperatura y algunos otros factores ambientales. Según Pederson (1979), los organismos que se espera crezcan primero en la leche son Streptococcus lactis (Lister) Lohm y Streptococcus cremoris Orla-Jensen, aunque en lugares tropicales se espera que predomine Streptococcus thermophilus. Todos estos organismos producen suficiente ácido como para prevenir el crecimiento de organismos no tolerantes al ácido que producen pudrición, mientras que promueve el crecimiento de bacterias lácticas más tolerantes al ácido, tales como Lactobacillus bulgaricus Orla-Jensen y Lactobacillus casei (Orla-Jensen) Hansen & Lessel.¹⁷

4. Secuencia generalizada de la elaboración de quesos

Prácticamente todas las variedades de quesos se elaboran siguiendo la secuencia de nueve pasos básicos que se presenta a continuación, variando el énfasis de cada paso según lo requiera la variedad de que se trate:

- a) Preparación de la leche. Para la incorporación de cultivos adecuados de microorganismos y para la formación del cuajo, ya sea ácido o de renina.
- b) Corte o ruptura del cuajo. Su finalidad es incrementar la expulsión del suero, además de que ayuda al paso siguiente, pues aumenta el área de exposición.
- c) Cocido del cuajo. Este paso ayuda a contraer los cuajos para proseguir la remoción del suero, además de que aumenta la textura y determina el contenido de humedad.
- d) Drenado. Separa aún más el suero residual.
- e) Enmallado. Transforma el cuajo en la textura característica del queso desecado, además de que le da tiempo para el desarrollo ácido y ayuda al control de humedad.
- f) Salado. La adición de NaCl influye en el sabor, la humedad y la textura.
- g) Prensado. Da la forma desecada y permite su configuración en un cuerpo consistente.
- h) Incorporación de microorganismos característicos. Esta incorporación depende del tipo de queso desecado, pues será responsable en gran parte de las características finales del queso.
- i) Almacenamiento. Mantenimiento del queso en las condiciones adecuadas para el crecimiento de los organismos.¹⁸

II. PROCESO DE MADURACIÓN DE LOS QUESOS

Algunos quesos, como el cottage o el queso crema, son consumidos como frescos, y representan una gran proporción dentro del consumo de quesos en muchos países: sin embargo, la mayoría de variedades de queso en general no están listas para el consumo sino hasta después de ser expuestas a un período de maduración, que puede variar entre 4 semanas y 2 años, habiendo variedades que pueden consumirse en diferentes etapas de maduración, según las preferencias con respecto al sabor.¹⁸ Por lo tanto, a pesar de que todos los quesos reciben cierto grado de maduración, ya que en todos están presentes bacterias activas, así como enzimas, que pueden causar la degradación de ciertos componentes como grasas, proteínas o azúcares, si son expuestos a temperaturas superiores a 4°C, aun por períodos reducidos de tiempo, más estrictamente se hace referencia a quesos madurados, como aquellos que son expuestos de manera explícita a temperaturas bien determinadas y durante períodos de tiempo definidos, a fin promover la acción de bacterias y/o enzimas que transforman el cuajo en un queso con sabor, apariencia y texturas específicos. Una característica adicional de los quesos madurados es que la coagulación se lleva a cabo casi exclusivamente con renina.¹⁹

Durante la maduración actúan combinadamente varios agentes, que pueden ser algunos de los siguientes o todos ellos:

-Coagulante (renina).

-Bacterias iniciadoras y enzimas.

-Microflora secundaria y sus enzimas. En este caso puede tratarse de la microflora endógena sobreviviente a la pasteurización o que se hubiera reincorporado después de la pasteurización, o bien de cultivos específicos añadidos al cuajo, p.e. Propionibacterium en el tipo Suizo, P. roquefortii Thom en el caso de Roquefort, y P. camembertii Thom en el Camembert. Asimismo, los quesos pueden adquirir una microflora superficial del ambiente del sitio de maduración, p.e. Brevibacterium linens (Wolff) Breed en Tilsit, Limburger, Münster y otros quesos europeos.

-Enzimas endógenas de la leche, especialmente proteasas y lipasas, que son particularmente importantes en los quesos hechos con leche cruda.^{18,20}

El proceso de maduración en su conjunto involucra una serie compleja de cambios bioquímicos, físicos y fisicoquímicos²¹ (Figs. 2 y 11). Los procesos bioquímicos iniciales son la hidrolización, llevada a cabo tanto por bacterias como por enzimas, de grasa, proteínas, lactosa y otros compuestos. Esta degradación da lugar a un cuerpo más suave y un sabor más aromático, que tiene relación principalmente con la transformación de las proteínas de una forma rígida e insoluble a formas nitrogenadas solubles, así como de la grasa que se degrada en ácidos grasos libres y glicerol.²²

Durante la maduración, el oxígeno utilizable es consumido rápidamente por las bacterias, por lo que el interior del queso cambia en muy poco tiempo a un estado anaerobio. En cuanto a carbohidratos se refiere, en aproximadamente 2 semanas, la lactosa es degradada en otros compuestos, quedando sólo trazas de azúcares. En la maduración normal de los quesos se produce bióxido de carbono como producto final a una tasa lenta y constante. Una fuente importante de este gas es la descarboxilación de aminoácidos que son liberados durante el proceso. En algunos quesos, como Camembert, Brie y Limburger, la producción de bióxido de carbono puede ser acompañada por amoníaco libre resultante de la desaminación de ciertos aminoácidos. La tasa de producción del

amoníaco se incrementa con la elevación normal del pH del queso durante el proceso de maduración.²² En esta serie de cambios se incluye la producción de una gran variedad de componentes hidrosolubles muy importantes para el sabor, como son péptidos, aminoácidos, aminas y productos carbonílicos. Se presume que es la proporción adecuada de cada uno de estos componentes lo que da a un queso madurado su sabor típico.^{20,22} Asimismo, esta serie de cambios involucra la producción de una gran cantidad de compuestos volátiles, como por ejemplo ácidos grasos, metil-cetonas, alcoholes secundarios y ésteres metílicos y etílicos. Algunos de estos compuestos contribuyen en gran medida al aroma de los quesos madurados.²³

Desde el punto de vista técnico, un queso es madurado al colocarlo en un cuarto con temperatura controlada, a una humedad relativa óptima por 2 a 48 meses. El queso puede ser encerado, envuelto en papel plástico, o bien su superficie puede ser desecada, o puede simplemente lubricarse su superficie después de sacarlo de la prensa o bien puede mantenerse intacto. Durante la maduración el queso puede ser volteado o no, así como puede ser salado en su superficie y/o limpiado periódicamente. El queso sin cáscara nunca es volteado en la maduración.¹⁹

A pesar de que durante la maduración se llevan a cabo un juego tan complejo de procesos bioquímicos, como son glicólisis, lipólisis y proteólisis, seguidos o sobrelapados por desaminación, descarboxilación, desulfuración, β -oxidación y algunos cambios sintéticos, como p.e. esterificación. La degradación de las proteínas (proteólisis) es considerada por muchos investigadores como la reacción principal en la maduración de los quesos.²⁰

1. Quesos madurados por bacterias y levaduras

Durante el período de maduración de los quesos, algunos microorganismos se desarrollan en su superficie. En algunos casos, la presencia de estos microorganismos es indeseable, pues se consideran contaminantes que pudieran afectar las características finales deseadas en el queso madurado. En estos casos, los quesos requieren de ser limpiados periódicamente, o bien ser envueltos, a fin de proteger su superficie de tales contaminantes potenciales; éste es el caso de los quesos duros y de los quesos semiduros madurados internamente por medio de la combinación de enzimas endógenas de la leche y de enzimas microbianas dispersas en todo el cuerpo del queso.²⁴

Sin embargo, existe un grupo de quesos en los que el desarrollo de microorganismos superficiales -que llegan incluso a formar una verdadera capa viscosa (rojo-anaranjada)- es no sólo deseable sino necesario para conseguir las características organolépticas en el queso que lo hacen distintivo. Este tipo de quesos son principalmente de tipo blando y maduran desde la superficie hacia el interior a través de la acción de enzimas secretadas por los microorganismos de la capa superficial. Existen también algunos quesos semiduros que maduran de la misma manera, pero aunado a la acción de enzimas presentes en el interior. En algunos casos se ha notado que la presencia de esta capa, aunque no formada intencionalmente, en ciertos quesos duros ha contribuido favorablemente al sabor.²⁴

Podemos dividir en tres grados la influencia de la capa superficial de microorganismos en las cualidades organolépticas de algunos quesos:

- a) Significativa: Tilsiter, Gruyere, Beaufort, Appenzeller.
- b) De Mayor Importancia: Trappist, Münster, Brick.
- c) Esencial: Romadour, Lederkranz, Saint Paulin.²⁵

Desde el punto de vista microbiológico, la microflora superficial depende de los microorganismos presentes en la salmuera y en los cuartos de maduración, aunque en términos generales se sigue un patrón similar al siguiente: los primeros microorganismos en desarrollarse son levaduras que toleran el pH bajo y altas concentraciones de NaCl; ocasionalmente son acompañadas por la presencia de Geotrichum candidum Link ex Lemm. Después de que la acidez ha declinado por la acción de las levaduras, se desarrollan formas bacterianas corineformes. Brevibacterium linens es la forma predominante y es esta bacteria la que produce el color característico rojo-anaranjado de la capa superficial, aunque pueden presentarse algunos otros microorganismos.²⁵

Con base en muchos trabajos de investigación se ha dilucidado el papel decisivo que tiene la capa superficial de microorganismos en el proceso de maduración de los llamados quesos madurados por bacterias.

2. Quesos madurados por hongos

Como norma general, al hablar de quesos madurados por hongos, siempre pensamos en los quesos Roquefort y Camembert, así como en sus tipos relacionados, aunque realmente no son éstos los únicos quesos madurados por hongos, además de que no son los hongos los únicos agentes responsables de la maduración, aunque sí los principales; los muchos millones de bacterias en el interior de los quesos, así como las levaduras y las bacterias superficiales presentes también juegan un importante papel en la maduración de esta familia de quesos.²⁶

En realidad, existe un pequeño número de otros quesos madurados por hongos, que son muy poco conocidos, ya que son producidos generalmente en pequeñas cantidades. En Francia, por ejemplo, existen las variedades llamadas "Saint-Nectaire" y "Tomme de Savoie", cuyas superficies están cubiertas con una compleja micobiota entre la que se cuentan especies de Penicillium, Mucor, Cladosporium, Geotrichum, Epicoccum y Sporotrichum. En la superficie de algunas especies italianas de queso también se ha descrito la presencia de algunos hongos, como por ejemplo Penicillium y Mucor en Taleggio y Geotrichum en Robiola.²⁷ Asimismo, en Japón existe una variedad de queso de soya en el que Aspergillus oryzae es el hongo más común. Gannemlost, por su parte, es un queso semiduro hecho en Noruega a partir de leche descremada, cuya superficie es rociada con una suspensión de Mucor rasmussen. El queso madura en un mes y adquiere un sabor especialmente aromático y picante. El hecho de no usar leche entera en la elaboración de este queso se debe a que el hongo Mucor tiene un sistema enzimático lipolítico muy fuerte que descompone la grasa excesivamente a un sabor demasiado rancio. De hecho, el sabor normal del queso, hecho con leche descremada, es un verdadero reto para aquellos que lo degustan, de tal manera que ha sido llamado el queso del "hombre fuerte" y es especialmente consumido por montañistas.²⁶

Algunos tipos de queso madurado por hongos son producidos en combinación con la bacteria Brevibacterium linens, como por ejemplo el auténtico Brie francés. Tanto el hongo como la bacteria crecen en la superficie para dar las características distintivas al queso. Existen quesos sólo distribuidos domésticamente que poseen sabores únicos debido a que presentan en su superficie una gran variedad de especies de hongos. El color que presentan varía de anaranjado a amarillo, o de verde y azul a blanco, y en ocasiones todas estas coloraciones aparecen en un solo queso.²⁶

En todos los casos de intervención de hongos en quesos es importante tomar en cuenta que la presencia de especies exóticas puede representar un riesgo, debido a la capacidad de estos organismos para producir ácido n-propiónico, aflatoxinas y toxinas²⁸, todos ellos metabolitos tóxicos sobre los que se profundizará más adelante.

III. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE LAS DOS PRINCIPALES ESPECIES DE Penicillium INVOLUCRADAS EN LA MADURACIÓN DE LOS QUESOS

(Las dos siguientes caracterizaciones son una traducción textual de Pitt, 1979²⁹)

1. Género: Penicillium

Subgénero: Penicillium

Serie: Varicata

Especie: Penicillium roquefortii Thom, 1906.

- CELA (Czapek - extracto de levadura - agar), 25°C, 7 días: Colonias de 40-70 mm de diámetro, planas o ligeramente sulcadas radialmente, estrictamente velutinas; márgenes bajos, comúnmente irregulares, frecuentemente abiertos y parcialmente sumergidos; micelio inconspicuo, blanco; conidiogénesis de moderada a marcada, en los márgenes gris turquesa (M. 24C3-4) o casi azul cielo glauco (R. 93), predominantemente verde mate (M. 25-26E4) o entre verde pistache y verde-azul glauco (R. 92-94), y algunas veces color café olivo en el centro (M.4D3-4) o casi color miel (R.63); exudado y pigmento soluble ausentes; reverso claro, café, o de verde a verde azul profundo, casi negro.

- Conidióforos: Nacen de las hifas subsuperficiales, estípites de 100-200 x 4.0-5.0 µm, con paredes delgadas y característicamente tuberculadas, que presentan penicilos grandes terminales, típicamente terverticilados, ocasionalmente cuadriverticilados, o raramente biverticilados, con elementos adpresos; usualmente una rama por penicilo, de 15-40 x 3.0-4.0 µm, con paredes tuberculadas; rámulas algunas veces presentes, de tamaño intermedio entre las ramas y las métulas; métulas 2-3 por rama, de (10-)12-15(-20) x 3.0-4.0 µm, usualmente con paredes tuberculadas; fiálides en verticilos de 5-8, ampuliformes, comúnmente de 8-10 x 2.5-3.0 µm, con cuellos cortos; conidios típicamente esféricos, relativamente grandes, de 3.5-4.0 (-6) µm de diámetro, con paredes delgadas, perfectamente lisas, con apariencia verde oscura en masa, nacidos en columnas largas cerradamente o de irregular a desordenadamente empacadas.

- Tipificación: La cepa Herb. IMI 24313 se designa aquí como lectotipo de P. roquefortii: de Thom (18) a NRRL (849) 1940, a LSHB (P93), a CMI 1948.

- Características distintivas: P. roquefortii es la única especie en la serie que crece muy rápidamente y produce colonias bajas y velutinas, que presentan estípites con paredes tuberculadas y conidios grandes, esféricos y con paredes lisas.

- Nomenclatura: Al describir a P. roquefortii como especie nueva, Thom (1906) notó que los aislamientos en cuestión se conocían comúnmente como P. glaucum en la industria quesera, pero sin evidencia de que estuvieran relacionados con Penicillium glaucum Link ex Grev. Este nombre ha sido una fuente persistente de error, y es invalidado.

- Taxonomía: Se le han dado algunos otros epítetos a los mohos azules o verdes de los quesos. Se han tomado en cuenta a Thom (1930) y Raper y Thom (1949) al colocarlos en sinonimia con P. roquefortii. A pesar de que la elaboración de variedades particulares de quesos depende indudablemente del uso de cepas específicas del hongo, éstas son indistinguibles bajo las condiciones usadas para la clasificación de especies, por lo cual no son reconocidas como especies separadas.

- Afinidades: De las especies de la serie, P. roquefortii tiene el mayor número de caracteres en común con Penicillium crustosum; éstas incluyen crecimiento rápido, conidios verde mate en masa y estípites con paredes conspicuamente corrugadas.

- Distribución: A pesar de que es mejor conocido por su papel en la elaboración de quesos, P. roquefortii es de hecho un agente biodeteriorativo ampliamente distribuido. Debido a que crece relativamente rápido a temperaturas de refrigeración, es una causa común de contaminación y descomposición en alimentos refrigerados, tanto comerciales como domésticos. Sin embargo, no se presenta en cereales ni en sus productos tan comúnmente como otros miembros de la serie.

2. Género: Penicillium

Sugénero: Penicillium

Serie: Camembertii

Especie: Penicillium camembertii Thom, 1906

- CELA (Czapek - extracto de levadura - agar), 25°C, 7 días: Colonias de 25-35 mm de diámetro, ocasionalmente más pequeñas, planas o ligeramente sulcadas radialmente, convexas, profundamente flocosas, márgenes enteros, profundos; micelio blanco; conidiogénesis de ausente a ligera, verde gris pálido o persistentemente blanca en algunos aislamientos; exudado claro algunas veces presente, sumergido en las capas miceliales; pigmento soluble ausente; reverso claro, amarillo o débilmente café-rojizo.

- Conidióforos: Nacidos de las hifas aéreas, estípites comúnmente de 200-400 x 3.0-4.0 μm , con paredes lisas o rugosas, típicamente portando penicilos terminales terverticilados o cuadriverticilados, algunas veces irregulares; ramas nacidas solas o en verticilos de 2-3, adpresas, comúnmente de 15-25 x 3.0-4.0 μm ; râmulas similares en tamaño a las ramas pequeñas, cuando presentes; métulas 3-5 por rama, de 8-12 x 2.5-3.5 μm ; fálides en verticilos divergentes de 3-5, ampuliformes, la mayoría 10-12(-15) x 2.5-3.0 μm , con cuellos largos y anchos, usualmente de 2.0-3.0 x 1.8-2.0 μm ; conidios subsferoidales, con paredes lisas, de 3.5-5.0 x 3.2-4.5 μm , nacidos en cadenas cortas desordenadas.

- Tipificación: La cepa Herb IMI 27831 se designa aquí como lectotipo de P. camembertii: de Thom (5) a Biourge, a Thom 1924, a NRRL (877) 1940, a LSHB, a CMI 1949.

- Características distintivas: Además de distinguirse por un solo hábitat, P. camembertii se caracteriza por la formación de colonias flocosas, que son incoloras con excepción del verde pálido de los conidios tardíos; los penicilos son grandes y frecuentemente irregulares, y los conidios son grandes y con paredes lisas.

- Taxonomía: Raper y Thom (1949) aceptaron dos especies de hongos que son importantes en la elaboración del queso blanco: P. camembertii y Penicillium caseicola Bain. Las dos especies se distinguieron por el color de los conidios, pues los conidios de P. caseicola permanecían blancos. Sin embargo, las características de crecimiento y la morfología macroscópica y microscópica de las dos especies son tan impactantemente similares que es difícil escapar a la conclusión de que las cepas con conidios blancos son mutantes seleccionadas de la especie con los conidios gris verde, perpetuadas y aparentemente confinadas a la elaboración de queso. Ha sido una práctica común no dar status taxonómico a los mutantes. Sin embargo, debido a que existen pequeñas dudas de su origen común, P. caseicola y Penicillium candidum Roger, según Biourge se enlistan como sinónimos de P. camembertii, el cual es el primer nombre válido de la especie parental.

- Afinidades: A pesar de que P. camembertii debe haber derivado de una especie ancestral común a otros miembros de la serie, la domesticación ha resultado en la pérdida de sus propiedades morfológicas, que de otra manera habrían provisto de claves en cuanto a sus relaciones con la sección.

- Distribución: Como ha sido indicado por numerosos autores, se sabe que P. camembertii y sus mutantes blancos derivados se presentan sólo en los quesos suaves, tales como el Camembert, Brie y Neufchatel, o en el ambiente local que rodea la elaboración de esos quesos. Thom (1906) afirmó que "La búsqueda persistente ha fracasado en encontrar una sola colonia (de P. camembertii) en América, cuya presencia se puede atribuir únicamente al queso Camembert importado de Europa.

Moreau³⁰ distinguió 4 formas diferentes de P. camembertii:

- Una forma con micelio veloso, blanca al principio volviéndose gris-verde (P. camembertii sensu stricto).
- Una forma con "pelos cortos", crecimiento rápido; blanca, densa, micelio cercanamente veloso.
- Una forma con "pelo largo", crecimiento lento; blanca, poco densa, micelio alto.
- La forma "neufchatel": vigorosa, crecimiento rápido dando un micelio grueso blanco-amarillento.

Las últimas tres formas corresponden al antiguo nombre de P. caseicola.³⁰ La forma "neufchatel" tiene actividades lipolítica y proteolítica ligeramente superiores a las de las demás.^{31,32}

1. Métodos de obtención de esporas de P. camembertii Thom y P. roquefortii Thom

a. Producción en gran escala de esporas de P. camembertii

Las esporas de P. camembertii se obtienen en gran escala mediante el siguiente procedimiento:

Se preparan cajas petri con agar de Czapek (Tabla 2) y se transfiere asépticamente un pequeño inóculo de un cultivo puro a la superficie del agar. Se incuban a 10°C y 90% de humedad relativa durante un mes. Posteriormente el inóculo se transfiere a un agar nuevo, y se repite el ciclo de crecimiento a 10°C.

Se prepara solución de Czapek, utilizando la misma fórmula, con excepción del agar, y se esteriliza en autoclave a 15 libras por pulgada cuadrada (l.p.c.) durante 20 minutos, y luego se deja enfriar. Tanto a la solución como al agar de Czapek se deben añadir aprox. 0.1% de extracto estéril de levaduras para estimular el crecimiento del hongo.

Posteriormente se añaden 1/2 libra (227 g) de galletas saladas para coctel en trozos pequeños a 125 ml de solución de Czapek en un matraz de Erlenmeyer estéril de 1 lt. El matraz se mueve de tal manera que las galletas se humedezcan completamente. Un tapón de algodón se cubre con papel de aluminio y se asegura con una liga al matraz y se esteriliza a 120°C, 15 l.p.c. por 30 min.

Se transfieren asépticamente alrededor de 2/3 del contenido de la caja de Petri que contiene crecimiento activo de P. camembertii a 100 ml de solución Czapek. El contenido se agita y se vierte asépticamente al matraz con los trozos de galleta. A continuación se sella la boca del matraz y se incorpora completamente el inóculo mediante agitación. Se repite el procedimiento para cada matraz y luego se incuban a 10°C y 90% de humedad relativa, durante dos meses. Después de este período aparecerá un densa capa de micelio y esporas. Para preparar la suspensión de esporas que se aplica directamente al queso, se vierte el contenido de los matraces en una licuadora, con un volumen igual de agua esterilizada. Se licúa hasta conseguir una suspensión fina.³³ Se filtra a través de algodón estéril y el filtrado puede asperjarse a los quesos.

b. Producción de esporas de P. roquefortii

Las esporas de P. roquefortii se pueden obtener en forma de polvo mediante la inoculación del moho en rebanadas estériles de pan de trigo entero. Éstas son posteriormente humedecidas ligeramente y son colocadas dentro de botellas estériles y selladas, mantenidas entre 8 y 12 días a una temperatura de 21°C, agitándolas ocasionalmente.

El pan densamente cubierto por el hongo es entonces cambiado del interior de la botella a un cuarto en el que la temperatura se mantiene alta para permitir su secado y permanece en éste por 3 días. Posteriormente, ya seco el pan con el hongo, es pulverizado y cernido a través de un tamiz del número 40.³⁴

IV. QUESOS MADURADOS POR P. roquefortii y P. camembertii Y SU PROCESO DE ELABORACIÓN.

1. Quesos de vena azul

Los quesos de vena azul utilizan para su maduración las especies de P. roquefortii, ya sea que crezcan naturalmente en el queso o que sea introducida en forma de esporas. En este tipo de quesos, además de utilizarse S. lactis y S. cremoris como iniciadores, se utilizan también generalmente S. lactis subsp. diacetylactis Matuskewski, Pijanowski & Supinska y algunas especies de Leuconostoc.³⁵ Su característica principal es su sabor picante, similar a especias. Los tipos más importantes son: Roquefort, Stilton, Gorgonzola, Queso Azul y Cabrales. Su nombre varía según el país o la región en que son elaborados y algunos detalles de su elaboración pueden variar de uno a otro (Tabla 3).

Roquefort. Se conoce con este nombre al queso elaborado en la región de Auvergné, al sur de Francia, el cual es hecho con leche entera de oveja. Estas ovejas, de tipo Laucanas, son pastoreadas en las colinas del distrito de Roquefort, y son criadas especialmente para la producción de leche, por lo cual están cubiertas por poca lana. Algunos quesos de este tipo eran mandados a Roma desde 250-100 A.C. y el nombre de Roquefort apareció hacia los años de 1070,²⁶ y actualmente está protegido internacionalmente como denominación de origen. El 31 de agosto de 1966, el Parlamento de Toulouse decretó una ley estipulando que el nombre Roquefort solamente podría aplicarse a los quesos madurados en las cavernas naturales de Roquefort.³⁵

En la elaboración de este queso se utiliza renina de oveja para la precipitación de las proteínas de la leche, en lugar de usar la enzima de origen ovino (Ver Cap. 1.4). Además, es característico de este queso el color blancuzco del coágulo, no producido por blanqueadores artificiales, sino causado por el color blanco natural de la leche de estas ovejas.²⁶ La elaboración sigue en términos generales el esquema que se mencionó anteriormente, excepto que en algunas ocasiones la leche no es expuesta a fermentación antes de la coagulación con renina; además el cuajo es inoculado con las esporas del hongo, lo cual es esencial para conseguir las características finales deseadas. Una vez que el cuajo ha sido drenado y moldeado en su forma final, es transportado a las cavernas de Roquefort²⁶ en donde una corriente subterránea mantiene a las cavernas naturales de limo de esta área a una temperatura y humedad constantes,³⁵ muy cercanas a las óptimas para el desarrollo del hongo. Sin embargo, actualmente, por razones de controles más estrictos de calidad y para minimizar las diferencias entre las condiciones particulares de los quesos, estas cavernas tienen un control artificial de humedad (95% hum. rel.) y temperatura (7°C)²⁶. Los quesos se mantienen durante tres meses en estas condiciones a fin de completar el periodo de maduración. Al inicio de este proceso, los quesos son cubiertos con sal y después pueden o no ser sumergidos en parafina³⁵ y les son introducidas agujas anchas, con lo cual se permite la entrada de aire al interior, lo cual es necesario para el desarrollo del hongo.²⁶ Entre 14-20 días después, los quesos no cubiertos de parafina desarrollan una flora superficial rojiza-parda que consiste en micrococos y B. linens. El encerado se realiza para controlar a esta última bacteria, pero en general se está de acuerdo en que las condiciones de maduración que promueven una flora superficial permiten la producción de queso

con un mejor sabor.³⁵ Las esporas de P. roquefortii germinan temprano en la maduración y el micelio es visible después de 8-10 días.³⁶

Stilton. Este queso es de origen inglés, y aunque reconocido localmente desde hace aproximadamente dos siglos, no tiene la importancia a nivel mundial que tiene el Roquefort. Es elaborado con leche de vaca y tradicionalmente no se utilizan agujas para horadarlo y permitir el crecimiento del hongo, sino que se mezclan cuajos nuevos con cuajos que ya han sido expuestos al aire, en el que existe gran cantidad de esporas de P. roquefortii. Sin embargo, actualmente es frecuente que se agreguen esporas a la leche o al cuajo y se hagan horadaciones con agujas. Una particularidad de este queso es que su superficie se cubre con una capa parduzca, debida al crecimiento de diferentes microorganismos,³⁷ entre los que se encuentran regularmente levaduras y lactobacilos, junto con formadores aeróbicos de esporas, cocos pigmentados y organismos coliformes.³⁵ Además, su sabor es ligeramente más suave y delicado que el del Roquefort.³⁷

Gorgonzola. Este queso es elaborado tradicionalmente en un pueblo con el mismo nombre al norte de Italia. Originalmente era producido a partir de leche de oveja, pero actualmente se utiliza en su lugar leche de vaca. Este queso es especialmente conocido en Europa aunque también es producido en otros países: se distingue de los otros quesos de vena azul por su mayor tamaño, además de su apariencia, pues tiene un color amarillento cremoso en el fondo y el hongo muestra un color verde-azul. Es más suave que el Roquefort en su consistencia y su sabor menos intenso. El proceso de su elaboración es en términos generales similar al de los demás quesos de vena azul: las esporas del hongo son agregadas a la leche, o bien se introducen entre capas adyacentes del cuajo fresco. Se forman entradas de aire con agujas, horadando al cuajo en todas sus caras y posteriormente son mantenidos durante 3 o 4 meses a una temperatura de alrededor de 10°C para su maduración.³⁸

Queso azul. El queso azul, que es hecho con leche de vaca, es conocido como Bleu en Francia, Blue en Estados Unidos y Danablu en Dinamarca. En este tipo de queso de vena azul el proceso de elaboración es prácticamente el mismo que se sigue con los demás quesos relacionados, sin embargo, mientras que en E.U. se prefiere el color blanco para el fondo del queso, para lo cual se llega a utilizar peróxido de benzoilo, en el caso en que la leche muestre un color demasiado amarillento, en el mismo queso elaborado en Dinamarca se busca obtener un fondo de color amarillo tenue y uniforme, además de que el sabor de este último es más suave que el de Roquefort y también más suave que el elaborado en E.U. y su consistencia más porosa.³⁹

Cabrales. Este queso es el más representativo de las variedades de quesos madurados por hongos de España. Tradicionalmente se elabora con una mezcla de leche de vaca, de oveja y de cabra. La mezcla de leche cruda se coagula con renina sin la adición de cultivos iniciadores ni la adición de esporas a la leche o al cuajo; los quesos sin prensar son salados en seco y posteriormente madurados. Se maduran en cavernas naturales en sótanos en las montañas Picos de Europa durante 3 o 4 meses bajo corrientes naturales de aire, y el producto ya maduro se vende envuelto en hojas de Acer pseudoplatanus.⁴⁰

Nuworld. Este queso es una variación del azul norteamericano, ya que mantiene el sabor típico de éste, pero se produce con cepas mutadas de P. roquefortii de color blanco.⁴² Estas cepas fueron obtenidas en la Universidad de Wisconsin mediante la exposición del hongo original a rayos ultravioleta.⁴¹ Aunque las cepas aún no son accesibles a nivel comercial, los quesos elaborados con ellas van dirigidos comercialmente a las personas a quienes no les agrada el comer queso que presenta micelio bien definido de color azul-verdoso.⁴²

2. Quesos suaves o de maduración superficial.

A pesar de que el primer lugar de importancia lo tienen los quesos de vena azul, sobre todo en Francia, el segundo lugar lo tienen los quesos suaves, es decir, Camembert, Brie y Coulommiers. Este tipo de quesos es conocido en Francia desde hace siglos y casi exclusivamente en este país mantienen aún actualmente su identidad individual y sus diferencias, ya que en otros países, aun en la misma Europa, se considera a Camembert y a Brie un mismo queso, lo mismo que el Coulommiers, si es que lo conocen⁴³ (Tabla 3)

Camembert. A pesar de la antigüedad de los quesos suaves madurados por hongos en Francia, la primera elaboración plenamente reconocida del Camembert es la que realizara Marie Harel desde 1791 en una villa de la provincia de Normandía en Francia, que naturalmente llevaba el mismo nombre. Sin embargo, algunos autores como Mocquot⁴⁴ reportan que existen citas de un queso francés con las mismas características que se remonta al siglo XIII en el volumen de Román de la Rosa, que está entre los más famosos de aquel período.⁴³ Existe una leyenda que indica que Napoleón Bonaparte nombró a este queso en honor a un pequeño poblado en el distrito de Orne, Francia, en donde lo probó por primera vez.⁴⁵

Sea cual sea el origen del Camembert y de su nombre, este queso es producido actualmente en Dinamarca, Alemania y E.U., además de su original Francia. En todos estos países el queso es cubierto en su superficie por una capa de micelio de color blanco de Penicillium camembertii; en cambio, el queso elaborado tradicionalmente en Francia presentaba en su superficie el crecimiento microbiano de varias especies que causaba la presencia de varios colores de colonias, aunque el fondo blanco del hongo predominaba; esto confería al queso de un muy agradable aroma. Actualmente los quesos elaborados en grandes cantidades no presentan tales colonias debido al control de calidad, aunque su aroma es menos atractivo. El sabor del Camembert es similar al de las nueces y su consistencia es suave y cremosa. El queso debe consumirse cuando su superficie es blanca, no parda, y su interior debe ser de un color amarillo intenso y antes de que sea oscuro; además, el queso, al ser cortado, debe mostrar un corazón central de color blanco y relativamente duro.

En Francia existen diferentes preferencias en cuanto al grado de maduración del queso, ya que algunas personas gustan de consumirlo una semana después de completado su proceso, otras dos semanas después, y aun otras lo consumen tres semanas después. Por esta razón, las compañías francesas distribuyen el queso en tres grupos de edades.⁴³ Generalmente, los consumidores europeos prefieren quesos cuyo sabor refleje no sólo las contribuciones de las fermentaciones lácticas primarias y las de los hongos, sino también los metabolitos de organismos secundarios de la maduración superficial, como los de B. linens y de otros corineformes asociados.⁴⁶ Las enzimas proteolíticas permanecen activas durante el periodo de comercialización, y, si no se consume, el queso se sobremadura o se vuelve desagradablemente suave y con olor y sabor a amoníaco.⁴⁵

En Francia, la elaboración del queso se inicia con una leche bien acidificada, de alrededor de 0.22% de acidez titulable, pues además de que ésto facilita el drenado, impide el crecimiento de microorganismos que pueden producir descomposición. En este tipo de quesos se utiliza como iniciador una mezcla de cepas de S. lactis y S. cremoris.³⁵ Durante las primeras etapas de formación del hongo en el cuajo, se desarrollan en su superficie Geotrichum³⁶ y algunas levaduras.³⁷ Estos organismos son tolerantes al ácido y a los altos niveles de NaCl, y utilizan el ácido láctico, por lo que

su función puede ser la de elevar el pH superficial antes de la germinación y el crecimiento de las esporas de Penicillium.³⁶ El nivel de pH en el queso maduro es de alrededor de 7.2.³⁷

Brie. Este queso era elaborado originalmente en las áreas de Melun y Meaux, a 30 millas al este de París. Tradicionalmente presenta en su superficie el crecimiento de la bacteria B. linens, aunado al del moho P. camembertii y al de varios otros microorganismos⁴³ que también crecen de manera adventicia, entre los que se han reportado Candida, Geotrichum y Mucor.⁴⁵ En suma, ellos conferieren al queso su sabor característico y su rápida maduración, motivo por el cual este queso debe consumirse rápidamente.⁴³

Coulommiers. Este queso se originó en la misma región que el anterior y es muy similar, excepto que es más ancho y pesado. Al igual que el Brie, es actualmente producido en otras provincias de Francia, como Normandía, Britania y las riberas del Mame.⁴³

V. SECUENCIA DE CAMBIOS MICROBIANOS Y BIOQUÍMICOS DURANTE LA MADURACIÓN DE LOS QUESOS MADURADOS POR HONGOS.

I. Secuencia Microbiana

Actualmente la producción comercial de los quesos Roquefort y Camembert se realiza a partir de leche pasteurizada, por lo que la microflora involucrada en estos procesos se limita a los organismos responsables de la fermentación, es decir, los estreptococos mesófilos lácticos S. lactis y S. cremoris, y el hongo con el que se inoculan para su maduración, según sea el caso. Sin embargo, en la elaboración tradicional de estos quesos se utiliza leche que no ha sido expuesta a ningún tratamiento térmico anterior, y en estos casos existe una microbiota secundaria que tiene un papel complementario en la formación de compuestos que confieren a los quesos sus propiedades organolépticas tradicionales o típicas. Por esta razón, el uso de leche pasteurizada trae como consecuencia la obtención de quesos con un sabor y aroma menos acentuados o neutralizados en cierto grado.

La secuencia microbiana en el Camembert tradicional involucra a muchos más organismos, de la siguiente manera: cuando el cuajo ha sido separado del suero tiene un pH de 4.5-4.6 y su microbiota está compuesta esencialmente por estreptococos mesófilos lácticos.⁴⁷ Posteriormente inicia en la superficie el crecimiento de algunas especies de levaduras, entre las cuales Kuyveromyces lactis, Saccharomyces cerevisiae y Debaryomyces hansenii son las más comunes; su crecimiento continúa hasta formar una capa de aproximadamente 200 μm de espesor, que cubre la totalidad del queso.⁴⁸ Al mismo tiempo en que aparecen las levaduras en la superficie inicia su desarrollo el mohó G. candidum, pero éste es inhibido al aumentar en el medio la concentración de NaCl por el proceso de salado. A partir del 6o. o 7o. día de maduración se hacen conspicuas las hifas de P. camembertii, y el crecimiento máximo se alcanza en los días 10-12,⁴⁹ llegando a cubrir la superficie del queso con su micelio.

En poco tiempo, P. camembertii habrá consumido completamente el ácido del medio, lo cual permitirá el establecimiento de una nueva biota bacteriana ácido-sensible en la superficie.⁵⁰ Esta biota está formada por micrococos y bacterias corineformes, principalmente B. linens.⁴⁹ También se han observado algunas especies de bacterias coliformes, siendo Hafnia alvei Moller la especie dominante.⁵¹ En el interior del queso los estreptococos lácticos son claramente dominantes, mientras que la población de levaduras presenta niveles menores a los de la superficie (10^6 células/g contra 10^8 células/g),⁵² al igual que la población de los coliformes⁵⁰ (Fig. 4).

En el caso del Roquefort tradicional, la biota inicial es también compleja ya que se utiliza para su elaboración leche cruda de oveja. Devoyod demostró que el queso además de contener bacterias lácticas, también contiene levaduras, lactobacilos, micrococos, estafilococos y bacterias coliformes.⁵³ Los estreptococos lácticos siempre son claramente dominantes en el interior del queso, pero las levaduras y los leuconostocs también están presentes desde el inicio de la maduración.⁵⁴ Los lactobacilos, principalmente Lactobacillus casei y Lactobacillus plantarum (Orla-Jensen) Bergey llegan a su nivel máximo de población justo antes del salado del queso.⁵⁵ Los estafilococos muestran una tendencia decreciente muy marcada durante las primeras 48 horas,⁵⁶ y las bacterias coliformes

disminuyen regularmente durante el primer mes.⁵³ Después del salado la biota superficial consiste principalmente en levaduras y micrococos. La formación de hoyos en el queso permite la entrada a una cantidad de aire suficiente para el crecimiento de *P. roquefortii*, cuya esporulación es visible dentro de la variedad 'blue d'Auvergne' de 2 a 3 semanas después de su elaboración.⁵⁷

2. Proteólisis y degradación de aminoácidos

a. Intensidad de la proteólisis

La proteólisis, al igual que la lipólisis y otras reacciones enzimáticas, se lleva a cabo en grados diferentes dependiendo de la microbiota (bacterias, hongos, levaduras, etc.) que contenga una determinada variedad de queso. En el caso de los quesos madurados por hongos, el grado de proteólisis es significativamente mayor que el que se lleva a cabo en muchos otros tipos de quesos. Como ejemplo, se puede comparar un queso Cheddar de 6 meses, que presenta un 3% de su nitrógeno total (NT) en forma de aminoácidos libres,⁵⁷ mientras que un queso de vena azul de la misma edad mostrará un nivel de hasta 10%.⁵⁸ Esta concentración de aminoácidos puede además conferir al queso una capacidad de buffer manteniendo el queso a un pH de alrededor de 6.5³⁶, lo cual ayudaría a la degradación enzimática más extensa de los constituyentes del cuajo.⁵⁹

En los quesos de vena azul, particularmente, la proteólisis es muy extensa; se han reportado niveles de más del 50% del NT en forma soluble a un pH de 4.6 en Roquefort madurado⁵³ y de alrededor del 65% en Danés Azul.⁶⁰ Esta fracción soluble contiene un alto número de péptidos pequeños; el nitrógeno no proteico (NNP: nitrógeno soluble en ácido tricloroacético al 12%) es de alrededor del 30% del NT.⁶¹ Los aminoácidos son abundantes, representando un 10% del NT en el Danés Azul.⁶² Godinlo y Fox notaron que la proteólisis es más limitada en la zona externa que en el centro del queso y sugirieron que el NaCl limita el crecimiento de *Penicillium* y su acción proteolítica.⁶¹

En el queso Camembert hay un grado menor de proteólisis que en el Roquefort, sin embargo, sigue siendo un nivel alto. En el primero hay un grado diferencial de degradación de las proteínas entre las zonas interna y externa del queso; en el exterior es de aproximadamente 35% el nivel de N soluble,⁶³ mientras que en el interior es de sólo 25%. La fracción soluble de N contiene muchos péptidos pequeños y el NNP es aproximadamente el 20% del NT. En el Camembert tradicional, el amonio representa 7-9% del NT,⁶⁴ y resulta de la extensa desaminación de los aminoácidos. Do Ngoc et al. compararon el perfil de aminoácidos del hidrolizado completo de caseína con los aminoácidos presentes en el queso madurado y notaron que: la alanina (Ala), la leucina (Leu) y la fenilalanina (Fen) se encuentran en mayor proporción, mientras que el ácido aspártico (Asp), la tirosina (Tir) y la lisina (Lis) en proporciones menores; la arginina (Arg) y la serina (Ser) se hallaron en cantidades particularmente pequeñas.⁶⁴ Esto muestra una liberación preferencial durante la proteólisis y también un catabolismo de aminoácidos libres. Estos datos nos permiten confirmar el alto nivel de degradación que sufren las proteínas en los quesos madurados por hongos, particularmente los quesos de vena azul, y en especial la degradación de la β -caseína que es mucho mayor que en muchas otras variedades.^{65,66}

Creamer⁶⁷ reportó que durante la maduración de los quesos la concentración de la β -caseína decrece, mientras que las concentraciones de las caseínas γ_1 y $-\gamma_2$ casi permanecen constantes (Fig. 5). Posteriormente, cuando se degrada completamente la β -caseína, la concentración de la caseína γ_1 decrece, a la vez que aumentan las concentraciones de las caseínas γ_2 y $-\gamma_3$. Marcos et al.

observaron, en un estudio comparativo de quesos europeos, que particularmente en las muestras de quesos madurados por hongos se nota que los niveles de β -caseína llegan a ser casi nulos y que se presentan en ellos bajos niveles de caseína γ_1 , y niveles mucho mayores de caseínas γ_2 y γ_3 .⁶⁵

b. Proteólisis de origen no fúngico.

El proceso completo de la proteólisis resulta de varios agentes complementarios, que son: enzimas coagulantes, proteínas endógenas de la leche y proteinasas de la microbiota secundaria. En el caso específico de los quesos madurados por hongos, esta microbiota secundaria, constituida por las especies de *Penicillium*, tiene el papel predominante en este proceso. Sin embargo, se notará el efecto que tienen también las fuentes no fúngicas de proteólisis.

La quimosina de la renina, como se mencionó anteriormente, es necesaria para desestabilizar las micelas de caseína, y su acción a corto plazo es muy específica, pero en las semanas y meses siguientes, durante la maduración, esta enzima contribuye a la proteólisis más generalizada en el queso. Se piensa que esta enzima produce una gran proporción de los péptidos mayores, de un P.M. mayor de 1400.⁶⁸

La acción de la renina es rápidamente detectable en los quesos por la hidrólisis de la α_{S1} -caseína y la producción del péptido α_{S1} -I. Este péptido es detectado en el queso Camembert después de 6 hrs. de drenado y su concentración aumenta durante la maduración; sin embargo, se ha observado también que la renina y la proteinasa aspártica de *P. camembertii* tienen una acción muy similar sobre la α_{S1} -caseína, lo cual impide una definición clara de las acciones respectivas de estas dos proteinasas sobre este sustrato después del 7o. día de maduración. También se ha observado una producción rápida del péptido α_{S1} -I en quesos de vena azul.⁶¹ En quesos simulados, Noomen demostró que la degradación de la caseína por medio de la renina es óptima a un pH de 5.0.⁶⁹ En el interior del queso Roquefort, el pH aumenta rápidamente hasta este valor, y después de un mes de maduración del Danés Azul, el pH es de 5.5⁶¹ y 6.0 en el 'Azul d'Auvergne'.⁵⁷ En la parte exterior del Camembert, el pH se incrementa más rápidamente, elevándose a más de 5.0 después de dos semanas, pudiendo llegar a 7.0 en 4-5 semanas.⁶³ En estas condiciones, uno puede suponer que la acción de la renina disminuye al final de la maduración, cuando el pH ha aumentado.

Se ha reportado que, en solución, la renina actúa sobre la β -caseína para dar lugar a tres péptidos N-terminales designados como β -I, β -II y β -III en orden de aparición y que presentan movilidad electroforética ascendente en gel de poliacrilamida a un pH alcalino.⁷⁰ Estos péptidos tienen movilidades mayores a la de la β -caseína debido a que las secuencias N-terminales son más ácidas que los péptidos apolares liberados del extremo C-terminal. Los tres enlaces peptídicos lisados por la renina se encuentran entre los residuos 164:165, 189:190 y 192:193, la hidrólisis de los cuales puede resultar en una proteólisis limitada de la β -caseína durante la primera etapa de elaboración de los quesos.⁷¹ Los péptidos β -I, β -II y β -III han sido identificados como las secuencias 1-189, 1-164 ó -166 y 1-139 de la β -caseína.⁷² Sin embargo, como en otros quesos, también en los quesos madurados por hongos la β -caseína es resistente al ataque por la renina; al menos esta degradación no ha sido detectada por electroforesis: los péptidos obtenidos *in vitro* por la hidrólisis de la β -caseína por la renina no han sido observados durante la maduración del Camembert o del Roquefort.⁷³

Además del péptido α_{S1} -I, Hewedi y Fox detectaron otros péptidos típicos de la acción de la renina (α_{S1} -V y α_{S1} -VII) en algunos quesos de vena azul.⁶¹ Sin embargo, los péptidos resultantes de la hidrólisis de la α_{S1} -caseína por las proteinasas de *P. roquefortii* tienen movilidades similares, si no

idénticas por electroforesis^{74,75}, lo cual podría explicar también la intensificación de las bandas α_{S1} -V y α_{S1} -VII durante la maduración⁷⁷.

En cuanto a las proteinasas de la leche, se sabe que su efecto es menor a aquel de la renina o de las enzimas microbianas durante la maduración.⁷⁶ Sin embargo, Trieu-Cout y Gripon⁷³ encontraron en el Camembert un claro incremento de γ -caseínas al final de la maduración, mostrando el incremento en la actividad de la plasmina, la principal proteinasa de la leche.⁷³ Esta actividad fue sugerida por primera vez por Noomen y el hecho no es sorprendente, ya que el pH de la región externa del Camembert al final de la maduración (7.0) no está lejos del pH óptimo de la plasmina, que es aproximadamente 8.0.⁷⁷

Trieu-Cout y Gripon observaron una intensificación en la banda IEF γ_2 , lo cual sugiere fuertemente que la plasmina permanece en el cuajo y que se vuelve activa cuando las condiciones del pH son más favorables a su acción sobre las caseínas.⁷³ Al final de la maduración, especialmente en la región exterior del Camembert, esta enzima es probablemente mucho más activa que en los quesos semiduros, en los que el pH permanece entre 5.0 y 5.2. Eigel (1977) estudió los efectos de la plasmina sobre las α_{S1} - y κ -caseínas, observando que la enzima prácticamente no tenía efecto alguno sobre la κ -caseína, aun después de 60 minutos de incubación, mientras que la α_{S1} -caseína desapareció gradualmente durante los 30 primeros minutos de incubación con la plasmina. La proteólisis fue acompañada por la formación de una banda polipeptídica con movilidad electroforética ligeramente menor a la de la α_{S1} -caseína y de varias bandas con movilidades electroforéticas mayores. Dos de estas últimas bandas contenían fósforo.⁷⁸ El papel general de las bacterias lácticas en los quesos, en cuanto a proteólisis se refiere, es el de producir péptidos de pequeño tamaño, así como aminoácidos libres. En los quesos madurados por hongos, el pH relativamente alto que presentan puede favorecer su actividad en cierto grado, en comparación con otros quesos, en los que la microbiota está compuesta en su mayoría por bacterias lácticas, pues el pH de estos últimos no les es favorable.⁷⁹

Algunas endopeptidasas de bacterias fermentativas lácticas pueden contribuir en cierto grado a la hidrólisis de la caseína. Por ejemplo, se ha observado que una endopeptidasa intracelular de *S. lactis* var. *diacetylactis* hidroliza la α_{S1} -caseína y parece ser específica para enlaces peptídicos que incluyen el grupo amino en los residuos hidrofóbicos, p.e. X-Leu o X-Phe.⁸⁰ Posteriormente se demostró que esta proteinasa también hidrolizaba los enlaces Pro₁₈₆-Ile₁₈₇ y Ala₁₈₉-Phe₁₉₀ en β -caseína, aunque la actividad era menor. Por otro lado, la enzima degradó eficientemente péptidos derivados de la β -caseína por la acción de la quimosina, atacando los enlaces Lis₁₇₆-Ala₁₇₇, Lis₁₆₉-Val₁₇₀ y Pro₂₀₆-Ile₂₀₇.⁸¹ Los autores de estas pruebas concluyeron que las proteinasas de las bacterias lácticas fermentativas actuaban principalmente en el queso degradando los péptidos liberados de la caseína por la quimosina.^{66,80,81} Esto es consistente con los reportes de varios grupos de investigación que observaron que los quesos hechos únicamente con quimosina, contenían nitrógeno soluble a pH 4.6, pero presentaban muy poco nitrógeno de péptidos y aminoácidos, mientras que los quesos hechos con quimosina y bacterias fermentativas, contenían relativamente grandes cantidades de N de aminoácidos libres.⁶⁶ Por lo tanto, se concluye que el papel más importante de las proteinasas y peptidasas de las bacterias lácticas fermentativas es la degradación de péptidos grandes derivados por la renina hasta pequeños péptidos y aminoácidos. En cuanto al papel que puedan tener algunos organismos oportunistas en la proteólisis, se sabe que es limitado, aunque se conoce el papel de algunos de ellos, ya que su presencia puede afectar positiva o negativamente el sabor final del producto. Como se mencionó anteriormente, *G. candidum* aparece frecuentemente en la superficie del Camembert, al menos durante una etapa de la maduración. El grado de proteólisis que puede realizar este organismo en este queso es difícil de determinar, pero es claramente menor al realizado por *P. camembertii*. Se sabe que *G. candidum* sintetiza proteinasas intra- y extracelulares, con un pH óptimo de alrededor de 6.0, aunque la producción de enzimas varía

grandemente de una cepa a otra.⁸² Se ha demostrado, de hecho, que la actividad proteolítica en la región exterior del Camembert tradicional no se ve incrementada durante el crecimiento de G. candidum, sino sólo durante el crecimiento de Penicillium.⁸³ Si G. candidum se inocula solo en la superficie de un cuajo, la proteólisis que causa es mucho menor en comparación a la alcanzada por P. camembertii.⁸⁴

Las levaduras tienen actividad proteolítica, aunque parece ser que es solamente intracelular. En Saccharomyces lactis, levadura presente en el Camembert tradicional, se caracterizaron y purificaron las exopeptidasas intracelulares, de las que se reconocieron una carboxipeptidasa y tres aminopeptidasas (AP_1 , AP_2 y AP_3) con características de metaloenzimas, y que presentaban respectivamente un pH óptimo de 5.0, 7.1 y 8.0, con una estabilidad máxima entre los niveles de 7.0 y 8.0 y con una temperatura óptima entre 40 y 45 °C.⁸⁵

B. linens secreta enzimas proteolíticas extracelulares, de las cuales se ha reconocido una proteinasa⁸⁶ y se ha aislado y caracterizado una aminopeptidasa,⁸⁷ además se han detectado varias peptidasas intracelulares⁸⁸. Aunque se reconoce que esta bacteria juega un papel importante en el desarrollo del sabor típico del Camembert tradicional, su papel en la proteólisis al final de la maduración es difícil de determinar.⁸⁹

c. Efecto de Penicillium en la proteólisis

Ha sido posible definir la intensidad de la proteólisis llevada a cabo por P. roquefortii y P. camembertii, con base en algunos estudios realizados en cuajos con microbiota controlada, en los que cada uno de estos hongos se ha desarrollado solo, sin ningún otro organismo.⁹⁰ Después de 40 días de maduración, la proporción de nitrógeno soluble a pH de 4.6, NNP y nitrógeno soluble en ácido fosfogústénico representaron alrededor de 50, 30 y 10% respectivamente, del nitrógeno total (NT). Estos valores fueron mucho mayores a los encontrados en los cuajos testigo, en los que solamente estaban activas la renina y la plasmina, lo cual demuestra que existe una producción extensa de péptidos de alto y bajo peso molecular, así como de aminoácidos libres. Esto demuestra también que estos hongos tienen enzimas con función endo- y exopeptidasas. Está claro que aunque la renina, la plasmina y otra microbiota tienen cierto efecto en la proteólisis de este tipo de quesos, las especies de Penicillium tienen el papel dominante en los quesos madurados por hongos.

Los sistemas proteolíticos extracelulares de P. roquefortii y P. camembertii son muy similares. Ambos hongos sintetizan una metaloproteinasa^{73,104} y una aspartato proteinasa,⁷² así como una carboxipeptidasa ácida⁹² y una aminopeptidasa alcalina.⁹³ (Fig. 6) P. roquefortii sintetiza, además, una o más carboxipeptidasas alcalinas y algunas cepas producen también una proteinasa alcalina.⁹⁴

Se ha observado que las cepas de P. camembertii tienen potenciales enzimáticos muy similares; Lenoir y Choisy observaron que la producción de enzimas proteolíticas, medidas a un pH de 6.0, variaban solamente en un factor de 2.⁹⁵ En cambio, los niveles de proteinasa producidos por P. roquefortii varían notablemente de una cepa a otra.⁹⁶

i) Propiedades de las proteinasas

Las propiedades de las proteinasas aspárticas, también llamadas proteinasas ácidas, de P. roquefortii y P. camembertii son muy similares.^{74,97} Su pH óptimo, se encuentra dentro del rango ácido (4.0 con hemoglobina como sustrato y 5.5 con caseína), y son estables entre pH 3.5 y 5.5 en P. camembertii y 3.5- 6.0 en P. roquefortii (Fig. 7). La enzima de P. camembertii hidroliza la α_{S1} -caseína mejor que la β - y la k-caseínas, con un radio relativo de acción de 1:0.7:0.6.⁹⁸ Las proteinasas ácidas de ambas especies tienen la misma acción en la caseína y 3 puentes de tipo Lis-X (Lis₉₇-Val₉₈; Lis₉₉-Glu₁₀₀ y Lis₂₉-Ile₃₀) son cortados más rápidamente que los otros.⁷⁴ De los 3 fragmentos con N terminal correspondientes, el péptido β_{411} (Val₉₈-Val₂₀₉) tiene menor movilidad electroforética que la β -caseína y es fácilmente detectable en los electroforetogramas de los quesos madurados por hongos.

Gripón y Hermier⁹⁹ y Lenoir y Auberger¹⁰⁰ encontraron que las metaloproteinasa de P. roquefortii y P. camembertii (Tabla 6) también tienen propiedades similares. Su pH óptimo se ubica entre 5.5 y 6.0 y son estables entre los valores de pH de 4.5 y 8.5, lo cual corresponde a las condiciones de los quesos referidos. Su especificidad es amplia y no sigue un patrón claro.¹⁰¹ *In vitro*, la enzima de P. camembertii corta a la α_{S1} -caseína mejor que a la β - o k-caseínas, con un radio relativo de actividad de 1:0.4:0.6,⁹⁸ asimismo, se ha observado que esta enzima ataca los enlaces Lis₂₈-Lis₂₉, Pro₉₀-Glu₉₁ y Glu₁₀₀-Ala₁₀₁ de la β -caseína.⁷⁵ Por otro lado, un estudio electroforético realizado con ambas especies de Penicillium demostró que las enzimas de ambas tienen formas de acción similares en α_{S1} - y β -caseínas.⁷⁵

Mientras que se tiene un conocimiento relativamente completo de las proteinasas de P. roquefortii y P. camembertii, el conocimiento que actualmente se tiene de las peptidasas intracelulares es muy limitado. Se han analizado extractos crudos de P. roquefortii, que muy probablemente tienen enzimas tanto intra- como extracelulares y se ha establecido en ellos un pH óptimo de 5.0-6.0.¹⁰² Lenoir y Choisy observaron que los extractos de P. camembertii representan un pH óptimo de 6.0 en caseína.⁹⁵ Takafuji y Yoshioka separaron 2 fracciones con valores de pH óptimos de 6.0 y 6.5; éstas hidrolizaban la β -caseína dando productos con baja movilidad.¹⁰³

ii) Acción de las proteinasas en los quesos

Cuando las proteinasas aspárticas de P. roquefortii o las metaloproteinasa de P. camembertii fueron agregadas a cuajos asépticos que sirvieron como control y que no contenían ninguna otra microbiota¹⁰⁴ se obtuvieron, después de la maduración, electroforetogramas muy similares a los de los quesos normales, mostrando que estas proteinasas juegan un papel esencial en los quesos madurados por hongos. Las enzimas citadas incrementaron notablemente el nivel de N soluble a pH de 4.6 de los cuajos de control, así como el NNP, pero no se detectaron aminoácidos libres.⁶⁶

Existen estudios en los que se ha realizado un seguimiento de la evolución de la actividad proteolítica durante la maduración del Camembert. Se reporta que dicha actividad es muy baja en el centro del queso y se mantiene sin cambios durante la maduración. Mientras tanto, en la región externa del queso esta actividad presenta un incremento repentino el 6o. o 7o. día de la maduración, lo cual concuerda con los días en que se inicia el crecimiento del hongo.¹⁰⁵ Esto manifiesta que tales enzimas son estables en el queso.

Trieu-Cout y Gripon⁷³ estudiaron el papel de las enzimas proteolíticas *in situ* siguiendo los cambios electroforéticos de los péptidos β_{ap1} y β_{mp1} , que son marcadores de la proteínasa aspártica y de la metaloproteínasa, respectivamente. El péptido β_{ap1} apareció poco después de la aparición de *P. camembertii*, y se intensificó de manera regular durante la maduración, indicando la acción continua de la aspartato proteínasa durante el proceso, a pesar de que las condiciones de pH del cuajo no fueran favorables a su acción. Por otra parte, el péptido β_{mp1} disminuyó después de 10-14 días de maduración, sugiriendo, por lo tanto, que la acción de la metaloproteínasa disminuyó, o bien que este péptido fue degradado activamente por otra proteínasa.

El hecho de que la actividad proteolítica sea muy lenta en el centro del cuajo del Camembert, aunque sea alta en la superficie durante la maduración, sugiere que la migración de las proteínasas de *Penicillium* es muy limitada en el cuajo.⁸³ Sin embargo, el péptido β_{ap1} ha sido detectado en el interior del Camembert a una profundidad mayor a 7 mm al final del periodo de maduración;⁷³ esto puede deberse a la migración de la aspartato proteínasa o a la del péptido β_{ap1} , y en general se está más de acuerdo con esta última.

Algunos estudios llevados a cabo con ayuda de la microscopía de barrido en el queso Camembert muestran alteraciones del micelio al final de la maduración,¹⁰⁶ y la acción de las proteínasas intracelulares no puede ser descartada. Sin embargo, los electroforetogramas realizados con el queso no mostraron la aparición de nuevos productos de hidrólisis, además de que la fracción soluble de N aumentó poco, después de 20 días de maduración, indicando que las proteínasas intracelulares juegan un papel más limitado que las extracelulares.

iii) Propiedades de las peptidasas

Algunos estudios con microbiota controlada han mostrado que *P. roquefortii* y *P. camembertii* pueden producir grandes cantidades de aminoácidos libres,⁹⁰ y en el mismo orden de magnitud que los encontrados en quesos normales.⁶⁰ Como anteriormente se dijo, *P. roquefortii* sintetiza varias exopeptidasas extracelulares. Una de ellas, la carboxipeptidasa ácida, es una carboxipeptidasa de serina con un pH óptimo de 3.5.⁹² Tiene una amplia especificidad y libera aminoácidos ácidos, básicos e hidrofóbicos. La aminopeptidasa alcalina, por su parte, es una metaloenzima con un pH óptimo de 8.0. Esta enzima libera aminoácidos apolares y se ha observado que la glicina en posición n-terminal o preterminal causa una actividad baja.⁹³ Paquet y Gripon¹⁰⁷ han observado algunas actividades de exopeptidasas intracelulares, que incluyen carboxipeptidasas ácida y alcalina y aminopeptidasa alcalina,¹⁰⁷ mientras que Ischima *et al.*¹⁰⁸ han caracterizado una carboxipeptidasa ácida intracelular. Su pH óptimo fue de 3.6 y la enzima se mantuvo estable en un intervalo de pH entre 2.0 y 6.0 a 30°C durante 20 minutos. La carboxipeptidasa perdió su actividad completamente cuando se trató a pH de 1.0, durante 20 minutos. Esta enzima se mantuvo estable hasta una temperatura de 40°C. Cuando se trató a 50°C durante 10 min., la carboxipeptidasa ácida perdió aproximadamente 15% de su actividad original.¹⁰⁸

P. camembertii también produce varias peptidasas. Ahiko *et al.* estudiaron la carboxipeptidasa ácida en esta especie y observaron que las propiedades de esta enzima correspondían a las de la carboxidasa de serina.¹⁰⁹ Se ha demostrado que esta enzima libera aminoácidos hidrofóbicos, lo cual a su vez causa que disminuya el nivel de sabor amargo del hidrolizado de caseína.¹⁰⁹ Dada su amplia especificidad, las carboxipeptidasas ácidas de las especies de *Penicillium* claramente deben contribuir a la hidrólisis de los péptidos de sabor amargo en los quesos madurados por hongos. Se ha demostrado que *P. camembertii* también sintetiza enzimas

intracelulares con actividad carboxipeptidasa, con un pH óptimo de 6.5,¹⁰⁵ así como actividades aminopeptidasa alcalina intra- y extracelulares.¹¹⁰

Recientemente, Yoko Fuke y su grupo¹¹¹ aislaron y purificaron una aminopeptidasa extracelular de P. camembertii. La enzima mostró actividad máxima a pH de 6.0-7.5. Su temperatura óptima fue 4°C y se mantuvo estable hasta 50°C. (Fig. 9) Se demostró su capacidad para liberar los residuos aminoterminales de Leu y Fen. También mostró una especificidad de amplio intervalo sobre dipéptidos y oligopéptidos.¹¹¹

d. Catabolismo de los aminoácidos

Actualmente se conocen muchas reacciones de degradación de aminoácidos que se llevan a cabo durante la maduración de los quesos madurados por hongos.¹¹² Por ejemplo, se sabe que la citrulina y la ornitina presentes en los quesos de vena azul y en el Camembert⁶⁴ resultan de la hidrólisis de la arginina, como fue demostrado en el queso Gorgonzola.¹¹³ Asimismo, el ácido τ -aminobutírico resulta de la descarboxilación del ácido glutámico.⁶⁴ Las reacciones de descarboxilación también dan lugar a la producción de aminas no volátiles, de las cuales la tiramina se presenta usualmente en cantidades mayores, en comparación con la triptamina y la histamina.¹¹⁴ Sin embargo, se ha detectado que la concentración de aminas varía notablemente entre las muestras de quesos madurados por hongos¹¹⁵ y parecen mostrar una tendencia a disminuir hacia el final de la maduración.¹¹⁴ Se ha reportado que P. camembertii actúa sobre la metionina realizando desaminación y desmetilación combinadamente para dar lugar a H₂S, sulfato de dimetilo y metanotiol, y que B. linens muestra la misma capacidad para producir estos compuestos.¹¹⁶

En un estudio a este respecto, Ferchichi *et al.*¹¹⁷ observaron que la metionina fue demetilada principalmente durante la fase de crecimiento exponencial del organismo, tiempo durante el cual las células presentaban forma de bastón y un tiempo de duplicación de 5 horas. Observaron también que al final del crecimiento las células presentaban forma de cocos y producían sólo niveles bajos de metanotiol. La producción de esta sustancia requería de la presencia de metionina en el medio de cultivo, reflejando esto la posible inducción de los sistemas enzimáticos involucrados. La glucosa favoreció el crecimiento de las bacterias, mientras que inhibió la producción de metanotiol; en contraste, el lactato favoreció tanto el crecimiento como la producción de metanotiol. La temperatura y pH óptimos para la producción se determinaron como 30°C y pH de 8.0.¹¹⁷ Se cree que el metanotiol puede estar relacionado con reacciones no enzimáticas, como la que resulta con el formaldehído para dar lugar al bis-(metiltio)-metano.¹¹⁸

La microbiota adventicia, dentro de la que se encuentran B. linens y algunas levaduras, causa desaminación de los aminoácidos, aunque las especies de Geotrichum¹¹⁹ son las que contribuyen mayormente a este proceso, y esto es de particular importancia en el Camembert, en el que el amonio representa el 7-9% del NT.⁶⁴ Lee *et al.* estudiaron el catabolismo de fenilalanina y tirosina por bacterias corineformes aisladas del Camembert^{120,121}; B. linens también degrada estos aminoácidos por transaminación y deflección del anillo de benceno por la 3,4-dihidrofenilacetato-2,3-di-oxigenasa. Esta enzima, así como la aminotransferasa, es inducible.¹¹²

En términos generales, el catabolismo de aminoácidos en los quesos madurados por hongos da lugar a la producción de compuestos volátiles, tales como amoníaco, aldehídos, ácidos, alcoholes y aminas.

3. Lipólisis

a. Grado de lipólisis

De la misma manera que la proteólisis, la lipólisis en los quesos madurados por hongos es más extensa que en otros quesos. Como ejemplo, podemos considerar a los quesos Gouda, Cheddar y Gruyere, en los que el grado de lipólisis no excede el 2% de los triglicéridos. En comparación, el nivel de lipólisis en los quesos madurados por hongos se sitúa entre el 5 y el 20%¹²² (Tabla 7). En realidad, los datos en la literatura varían mucho, lo que puede deberse a que las muestras sean tomadas a diferentes niveles de maduración, aunado esto al hecho de que las características de las cepas varían de una variedad a otra: 'Blue d'Auvergne' requiere cepas altamente proteolíticas y con baja actividad lipolítica, mientras que 'Fourme d'Ambert' necesita cepas con baja actividad tanto proteolítica como lipolítica.¹²⁴ Anderson y Day describen haber encontrado niveles de ácidos grasos libres de 65-100 meq/100 g de grasa, lo cual representa entre un 18 y 25% de los ácidos grasos totales en quesos de vena azul;¹²⁵ por otro lado, otros investigadores describen niveles menores de lipólisis en el Danés Azul: 45 meq/100 g de grasa.¹²²

En el Roquefort, el grado de lipólisis es de 16-23% de los ácidos grasos totales. Tanto el micelio como las esporas de este hongo son fuertemente lipolíticos y el crecimiento del mismo es parcialmente controlado por la concentración de NaCl en el queso.⁵⁸ Godinho y Fox¹²⁶ demostraron que el crecimiento de *P. roquefortii* era más rápido en la región de profundidad media del queso, en comparación con la región superficial y central del mismo, ya que las concentraciones muy altas o muy bajas de NaCl son inhibitorias para la lipólisis, mientras que las concentraciones intermedias (1-3% p/p) son estimuladoras;¹²⁶ esto confirma el nivel menor de ácidos grasos libres en la superficie del queso azul, ya que la producción de lipasas es inhibida, así como la lipólisis¹²⁷ *per se*. El nivel de ácidos grasos libres presenta un incremento regular durante la maduración, según Morris *et al.*,¹²⁸ aunque otros autores observaron una disminución de los niveles hacia el final de dicho período.^{127,129}

También en el Camembert hay diferencias en cuanto a niveles de lipólisis descritos: en el Camembert Norman, hecho con leche cruda, la lipólisis llega a ser de 6-10% del total de ácidos grasos,¹³⁰ pero en otras muestras, probablemente menos típicas, se encontraron valores menores: 3-5%.¹²² Lo que está bien establecido es que la lipólisis siempre es mayor hacia la superficie. La mayor parte de ácidos grasos libres en este tipo de quesos son resultado de lipólisis; los ácidos grasos de cadena corta, que resultan de la degradación de la lactosa o de algunos aminoácidos, representan solamente el 5% de los ácidos grasos libres totales.¹³¹

b. Propiedades y efectos de las lipasas de *Penicillium* sp.

Las especies de *Penicillium* son los agentes esenciales en la lipólisis de los quesos madurados por hongos. Se ha demostrado que la lipasa natural de la leche no es muy activa, aun en quesos hechos con leche cruda.¹²⁸ Con excepción sólo de *G. candidum*, ningún otro organismo, aparte de las especies de *Penicillium*, presenta una actividad lipolítica importante en estos quesos. En el Camembert, las proporciones relativas de ácidos grasos libres son diferentes a las de los triglicéridos de la leche, ya que las primeras tienen una mayor concentración de ácido oleico.¹³⁰ Esta proporción particularmente alta de ácido oleico libre en el Camembert ha sido atribuida a la lipasa de *G. candidum*, que presenta una actividad preferencial hacia este ácido.¹³⁰

Lamberet y Lenoir reportan que *P. camembertii* produce sólo una lipasa extracelular, la cual presenta actividad óptima a pH de 9.0 en tributirina a 35°C. El nivel de producción de esta enzima varía de 1 a 10, en escala relativa, dependiendo de la cepa. A pH de 6.0, esta lipasa mantiene el 50% de su actividad máxima y es muy activa entre 0 y 20°C. Su actividad se estimula cuando hay presencia de iones Ca^{2+} .¹³² El estudio del Camembert de leche cruda durante su maduración ha permitido conocer la secuencia de producción de lipasa: la actividad aparece tras 10 días de maduración, durante el crecimiento del micelio o poco después; alcanza el nivel máximo a los 16 días y después comienza a decrecer ligeramente hasta el día 30, cuando su nivel aumenta nuevamente, por la lisis del micelio. Se midió la actividad lipolítica en 10 quesos de diferente origen, registrándose valores que variaron entre 1.2 y 4.45 unidades/g de queso.¹³³

Se ha observado que *P. roquefortii* produce 2 lipasas; para una de ellas el pH óptimo está dentro de los valores ácidos, mientras que la otra presenta actividad óptima a pH básicos.¹³⁴ Varios autores han descrito un pH óptimo para la enzima alcalina de 7.5-8.0^{135,136}, aunque también se han descrito valores de pH óptimo a 9.0-9.5.¹³⁴ A pH de 6.0 esta enzima retiene aún el 20% de su actividad. La actividad máxima de la lipasa ácida se presenta a pH de 6.0-6.5¹³⁷ (Fig. 10)

Las especificidades de estas dos enzimas son diferentes; la lipasa ácida es más activa en tricaproína¹³⁷ mientras la alcalina lo es en tributirina. Se han medido ambas enzimas *in situ*¹³⁸ y se ha encontrado que en 6 de 7 muestras el nivel de la lipasa ácida era mayor.¹³⁹ Aunque a primera vista pueda parecernos que de las dos lipasas sólo la enzima ácida es significativa en la maduración de este queso, a pesar del pH favorable en el queso, puede ser que no siempre juegue el papel principal, ya que la lipasa alcalina tiene una actividad comparativamente mayor en la grasa de la leche aislada.¹³⁷ Lo que se supone es que la actividad combinada de ambas lipasas, con diferentes niveles relativos de actividad y diferentes especificidades es lo que da al queso referido las cualidades deseadas.

c. Ácidos grasos y su conversión a metil-cetonas

Los ácidos grasos como tales son tóxicos para *P. roquefortii* y el grado de toxicidad depende de la longitud de la cadena y de la concentración de los ácidos grasos, así como del pH del medio de incubación.^{140-142,129} Pressman y Lardy reportaron que los ácidos grasos saturados desacoplan la fosforilación y el ácido miráctico exhibió el mayor efecto,^{129,143} el cual decrecía progresivamente cuando la cadena de carbonos del ácido se acortaba o se alargaba.¹⁴³ Se ha sugerido que la conversión de los ácidos grasos a metil-cetonas puede ser un mecanismo destoxicante.^{144,145}

Dwivedi y Kinsella¹⁴⁶ describieron que las concentraciones mayores de ácidos grasos sólo tuvieron un efecto inhibitorio temporal en el sistema enzimático encargado de su metabolismo. Estos investigadores obtuvieron datos que indican que los ácidos octanoico y decanoico son utilizados preferentemente por el micelio del hongo en comparación con los ácidos hexanoico y dodecanoico. Los datos de su trabajo muestran que tanto el micelio fresco como el micelio maduro son igualmente capaces de formar metil-cetonas después de un período estacionario inicial; sin embargo, este período estacionario fue mayor con el micelio fresco en comparación con el micelio maduro. Asimismo, observaron que la adición de sal era responsable de que el período estacionario (fase lag) se prolongara antes de la producción de los compuestos carbonílicos, aunque después de 48 hrs. de incubación la concentración de estos compuestos era similar entre las soluciones con sal y sin sal.¹⁴⁶

Lawrence y Hawke¹⁴² sugirieron que la regulación celular de la oxidación de ácidos grasos y formación de metil-cetonas provee de un medio alternativo para reciclar la coenzima A cuando la oxidación de acetil CoA está desacoplada,¹⁴⁴ lo cual es consistente con la formación de metil-cetonas como mecanismo destoxicante.¹⁴⁶ Actualmente se sabe que el mecanismo de formación de metil-

cetonas a partir de ácidos grasos efectivamente se lleva a cabo vía β -oxidación de la siguiente manera: la β -cetoácido-CoA, obtenida por la deshidrogenación de la β -hidroxiacil CoA, es desacilada a un β -cetoácido por la enzima β -cetoacil-CoA desacilasa, o tiohidrolasa. Posteriormente, una descarboxilasa convierte el β -cetoacil en una metil cetona y CO_2 ⁹⁶ (Fig. 11)

Durante cierto tiempo existió una controversia en cuanto a si son las esporas o el micelio del hongo los responsables de la formación de las metil-cetonas. En varios trabajos se ha consignado que mientras Gehrig y Knight (1958, 1961, 1963) describieron que solamente las esporas de *P. roquefortii* son las responsables de la producción de estos compuestos, otros muchos autores han demostrado que el micelio también puede oxidar los ácidos grasos a metil-cetonas (Rolinson, 1954; Vince y Ghosh, 1962; Lawrence y Hawke, 1968). ^{144,145,147}

A pesar de que el trabajo de Knight fue fundamental, sus conclusiones estuvieron influidas por la falta de consideración de varios factores, lo cual deja muchos puntos oscuros. Posteriormente, Lawrence (1965b) observó que la adición de azúcares o aminoácidos con ácidos grasos a suspensiones de esporas latentes estimulaba la oxidación de los ácidos grasos con la consecuente producción de metil-cetonas. Se especuló que los azúcares y aminoácidos activaban a las esporas induciendo germinación y en consecuencia estimulaban la producción de metil-cetonas. ¹⁴⁷

El trabajo de Fan et al. ¹⁴⁸ aclaró muchos de estos puntos oscuros y permitió tener una idea mucho más completa del papel de las esporas y el micelio del hongo en la oxidación de los ácidos grasos. En dicho trabajo se estudia primeramente el patrón de germinación de las esporas de *P. roquefortii*, reportándose que dicho patrón es similar al descrito para otras especies fúngicas. La secuencia de germinación envuelve el hinchamiento inicial de las esporas en reposo, seguido de la formación de tubos germinales y su subsecuente alargamiento en hifas y micelio. Las esporas en reposo comenzaron a hincharse aproximadamente después de 4 h de haber sido inoculadas en el medio de germinación. Se observó la emergencia de los tubos germinales entre 11 y 12 h después de comenzada la incubación de las esporas. El número de esporas germinadas se incrementó rápidamente, y después de 14 h se encontró un 80% de germinación (Fig. 12). La germinación máxima se encontró a las 16 h, cuando se alcanzó un nivel de 91% y posteriormente, este nivel se mantuvo. La elongación de los tubos germinales mantuvo una tasa constante de 20 $\mu\text{m}/\text{h}$ para cada espора durante las 14-40 h de incubación.

El proceso de germinación se puede dividir arbitrariamente en cinco fases: esporas en reposo (0 h), esporas hinchadas (1-10 h), etapa de emergencia del tubo germinal (11-16 h), etapa de alargamiento del tubo germinal (17 h en adelante), y micelio. En general, es difícil determinar en qué etapa los tubos germinales se desarrollan en micelio. ¹⁴⁸

Durante la germinación, el peso seco de las esporas se incrementa debido a la absorción de nutrientes exógenos presentes en el medio. Este incremento es muy lento durante la fase de hinchamiento, pero se vuelve muy rápido durante la emergencia y alargamiento del tubo germinal. La microscopía electrónica reveló que la pared celular de la espора en reposo consiste en cuatro capas P1, P2, P3 y P4 (Fig. 13). La capa más externa (P1) se rompe y separa durante el hinchamiento de la espора en reposo. La pared celular del tubo germinal es mucho más delgada que la de la espора y tiene solamente la capa transparente a los electrones (P3). La capa más externa en la espора en reposo (P1) no se observa en la pared celular del micelio. ¹⁴⁸

Con base en los datos obtenidos en este estudio se deduce que la fisiología de la espора claramente afecta la tasa de formación de metil-cetonas. Las esporas en reposo muestran una actividad apreciable en la formación de las metil-cetonas. Sin embargo, mientras las esporas germinan, su actividad se ve reducida a pesar de su masa celular mayor (Fig. 14). La cantidad de 2-heptanona producida por las esporas en las etapas de hinchamiento y de emergencia del tubo germinal es considerablemente menor a la producida por las esporas en reposo. Así también, sus periodos estacionarios se alargan. La productividad de 2-heptanona es mínima en la etapa de emergencia del tubo germinal. Una vez que es alcanzada la etapa de máxima germinación, la

capacidad de las esporas para la producción de la metil-cetona se recupera a un nivel que excede ligeramente al de las esporas en reposo. Después de la etapa de alargamiento del tubo germinal, las esporas son extremadamente activas en el metabolismo del ácido octanoico.¹⁴⁸

En los inicios de la etapa de alargamiento (20 h de germinación), las esporas muestran la menor eficiencia en la formación de 2-heptanona por unidad de peso, mientras que las esporas en reposo y las germinadas en 24,28 y 32 h. presentan tasas comparables de producción de la metil cetona. El ácido parece inhibir la producción de 2-heptanona en varias etapas de la germinación. Las esporas en reposo son más resistentes a esta inhibición¹⁴⁸ (Tabla 8).

En general, se ha observado una correlación positiva entre el nivel de ácidos grasos libres y la producción de metil-cetonas,⁹⁶ pero mientras la mayoría de metil-cetonas mayores son presumiblemente derivadas directamente de los ácidos grasos correspondientes por oxidación, las concentraciones de metil-cetonas C₇ y C₉ exceden los radios molares de los ácidos grasos C₈ y C₁₀ correspondientes en la grasa de la leche, indicando su posible derivación a partir de los ácidos grasos de cadena mayor.¹⁴³

Dartey y Kinsella (1973a, 1973b) observaron la degradación del palmitato de sodio¹⁴³ y del ácido láurico¹⁴⁵ por esporas de *P. roquefortii*, y en ambos casos se observó la formación de una serie homóloga de metil-cetonas (C₃-C₁₅ inclusive), además de alcanales, alquenes,alcadienales y otros compuestos carbonílicos, aunque ciertamente se observó también que en el caso del palmitato fue la pentadecanona la metil cetona predominante¹⁴³, así como la undecanona lo fue para el ácido láurico.¹⁴⁵ En ambos trabajos, la actividad máxima de las esporas se encontró a una temperatura de 30°C y a un valor de pH de 6.5. Se deduce que la presencia de metil-cetonas de cadena corta como producto de estos dos ácidos de cadena larga denota a estos últimos como fuentes de metil-cetonas.

4. Degradación de la lactosa y contenido de ácido láctico

Como se mencionó anteriormente, los organismos utilizados como iniciadores de la fermentación en la producción del Camembert son principalmente estreptococos mesófilos lácticos, que producen ácido láctico a partir de la lactosa por la vía del difosfato de hexosa. La renina se agrega a la leche tras cierto tiempo necesario para que ésta alcance un pH de alrededor de 6.4. Durante el drenado del cuajo se lleva a cabo una intensa acidificación del mismo, y al ser vaciado en los moldes su pH es de 4.6. La cantidad de lactosa residual en el cuajo decrece rápidamente después de 5 a 10 días de su procesamiento, lo cual corresponde a los días de aparición de *P. camembertii*; posteriormente, la lactosa sigue disminuyendo, aunque más lentamente.¹⁴⁹ La lactosa llega a desaparecer completamente después de 20-30 días de maduración, lo cual se alcanza más rápidamente en la superficie que en el centro del queso. La concentración de otros azúcares, como la galactosa y la glucosa, es demasiado baja en el Camembert.¹⁴⁹

La microbiota láctica del Roquefort incluye, además de estreptococos homofermentativos, leuconostocs y otras bacterias, que convierten la lactosa en ácido láctico, ácido acético, etanol y CO₂.⁵³ Este gas permite la formación de pequeñas aberturas en el cuajo, lo cual ayuda al desarrollo de *P. roquefortii*; además las levaduras presentes en el cuajo también degradan la lactosa,^{53,54} contribuyendo a la formación de estos espacios.

El ácido láctico producido por las bacterias fermentativas en los quesos madurados por hongos es utilizado posteriormente por los hongos y las levaduras. Berner observó en el Camebert niveles iniciales de L-lactato de 2.9% (materia seca) en la superficie y de 3.6% en el centro del queso. Se observa un decremento rápido de estos niveles entre los días 5o. y 10o. de la maduración, lo cual coincide con el crecimiento de *Penicillium*; la cantidad de L-lactato en el queso madurado es de

0.02%¹⁵⁰ El isómero D-lactato se presenta sólo en pequeñas cantidades, y al final de la maduración casi ha desaparecido completamente.¹⁵¹

Trieu-Cout y Gripon (1982)⁷³ observaron que después de 6 h de drenado, el cuajo del Camembert tiene un pH de 4.86; durante los primeros 3 días de maduración éste se reduce hasta 4.60 debido a la degradación de la lactosa residual por parte de las bacterias ácido lácticas. A partir del 7o. día y hasta el 28o. día de maduración se estableció un gradiente de pH entre la superficie y el centro del queso. Esto se debió principalmente a la utilización del ácido láctico por *P. camembertii*. En el centro del queso el pH se incrementó lentamente hasta el día 28 de maduración y posteriormente se incrementó rápidamente hasta alcanzar un valor igual al medido en la superficie el día 35 de la maduración⁷³ (Fig. 15). Posteriormente, Schlessler y su equipo (1992)²¹ han confirmado lo anterior, explicando que el incremento en el pH en el Camembert puede ser explicado por la asimilación del ácido láctico y la desaminación de los aminoácidos realizadas por *P. camembertii*.²¹ La elevación del pH no es tan extrema en los quesos de vena azul: sin embargo, el pH del 'Blue d'Auvergne' llega a valores de 6.2⁵⁷, y de 6.5 en el Danés Azul.⁶¹

La neutralización del queso juega un papel importante en el proceso de la maduración. Debido a esta neutralización, algunas bacterias ácido sensibles, que incluyen micrococos y bacterias corineformes, se establecen en la superficie del Camembert y sus tipos relacionados y contribuyen a sus características tradicionales de sabor. La neutralización también favorece la acción de varias enzimas que tienen un papel importante en la maduración, cuyo pH óptimo está más cerca de la neutralidad que de los valores ácidos.¹⁵² Además, se ha observado que la neutralización causa migración de minerales dentro de los quesos madurados por hongos; Le Graet et al.¹⁵³ mostraron que hay una migración considerable de calcio y fósforo inorgánicos (17 y 9 g/Kg respectivamente) en los quesos suaves; estos valores fueron menores en el centro de los quesos. Estos mismos autores también reportaron que el pH alto de la superficie causaba la formación de fosfato de calcio insoluble, inmovilizándose esta sal en la corteza. Estos datos pueden ser de interés nutricional, ya que al final de la maduración la corteza del queso contiene alrededor del 80% del Ca y el 50% del contenido total de fósforo.¹⁵³

VI. RELACIÓN DE LOS COMPUESTOS FORMADOS DURANTE LA MADURACIÓN CON LAS CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DEL QUESO.

1. Ácidos grasos libres

Se encuentran varios reportes en los que se asegura que los ácidos grasos per se tienen sabores definidos y agradables^{58,96} y que se considera que estos compuestos derivados de la leche contribuyen al sabor de los quesos maduros de diferentes variedades¹²³. Sin embargo, algunos otros autores, como Seth y Robinson⁴⁹ describen que no existe una correlación en cuanto al alto nivel de ácidos grasos libres presentes en la gran mayoría de quesos, en particular en los quesos madurados por hongos, y la intensidad del sabor del queso. Más bien, los ácidos grasos libres dan lugar a un cierto sabor rancio fácilmente perceptible. El término rancidez se utiliza frecuentemente para describir la presencia del ácido butírico, el cual es liberado de la base de glicerol de un triglicérido por la acción de una lipasa. Por otro lado, es una consideración general que la presencia de altos niveles de ácidos grasos libres, además de tener una influencia negativa directa en el sabor de los quesos, tiene efectos adversos en la calidad del mismo, ya que inhibe el crecimiento de microorganismos responsables de la biosíntesis de otros constituyentes importantes para el sabor.⁴⁹

Sin embargo, aunque los ácidos grasos libres no confieren a los quesos características deseables por sí mismos, tienen una gran importancia, en particular en los quesos madurados por hongos, porque sirven como sustratos para la formación de metil-cetonas y alcoholes secundarios.

2. Metil-cetonas

Se ha demostrado que las metil-cetonas tienen un papel esencial en cuanto a las características de sabor y aroma de los quesos madurados por hongos y excepcionalmente en los quesos de vena azul. Las moléculas más importantes por su abundancia son la 2-heptanona y 2-nonanona; también se presentan frecuentemente 2-pentanona, 2-propanona, 2-undecanona y 2-tridecanona, aunque en cantidades menores.^{147, 96} (Tabla 9). Existen, sin embargo, grandes variaciones entre muestras, tanto de concentraciones individuales como totales de metil-cetonas, por lo cual es difícil establecer patrones. Dartey y Kinsella observaron que la concentración total de metil-cetonas aumenta hasta el día 70 de la maduración, y posteriormente disminuye.⁴¹

Así también, se ha observado que los quesos en los que hay una lipólisis limitada no tienen un aroma fuerte,⁹⁶ pero que al añadir lipasas al cuajo se favorece la aparición de metil-cetonas,¹⁵⁴ y por ello, tanto el sabor como el aroma se intensifican.

La importancia de las metil-cetonas, aunque menor que en los quesos de vena azul, es también considerable en el Camembert, ya que estos compuestos, junto con los alcoholes secundarios, son algunos de los principales elementos neutros de la fracción volátil de estos quesos. Lamberet et al. reportaron que la capacidad de P. camembertii para producir metil-cetonas varía notablemente entre las diferentes cepas.¹⁵⁵

La fracción volátil de los quesos madurados por hongos incluye muchos otros elementos además de las metil-cetonas, entre los que destacan los alcoholes secundarios, ésteres, aldehídos y los compuestos sulfurados

3. Alcoholes secundarios

Los alcoholes secundarios son producidos en los quesos madurados por hongos por Penicillium sp. a través de la reducción de las metil-cetonas. Los alcoholes más comunes en el Roquefort son 2-pentanol, 2-heptanol y 2-nonanol.¹⁵⁶ En el Camembert, el 1-octen-3-ol juega un papel particular, pues es el responsable de la nota a champiñón en el sabor característico del Camembert⁴⁶ (Tabla 10). Sin embargo, cuando el nivel de este alcohol es demasiado alto, el aroma es defectuoso. Se cree que el origen del 1-octen-3-ol es la oxidación de los ácidos linoleico y linolínico por P. camembertii vía conversiones lipoxigénicas.¹⁵⁷ La formación de alcoholes secundarios vía reducción de metil-cetonas se considera un mecanismo similar a la fermentación alcohólica que tiene lugar en las levaduras o a la formación de ácido láctico en el músculo, siendo el catalizador de la reacción una deshidrogenasa de alcohol específica, precipitable con sulfato de amonio.¹⁷¹

4. Proteínas

Las proteínas, mientras no sean degradadas en compuestos más pequeños, tienen muy poco sabor; sin embargo, la presencia de proteína no disuelta tiene gran influencia en el sabor del queso, ya que suaviza la presencia de los diferentes sabores, haciéndolos menos agudos, así como permitiendo la mezcla de sabores de varias sustancias.¹⁵⁹ En el proceso de maduración de los quesos, la proteólisis de la caseína da lugar como productos iniciales a los péptidos, dipéptidos y aminoácidos (Fig. 2), y ya que todos estos compuestos, así como la propia caseína, no son volátiles, no contribuyen al aroma del producto final, sino solamente a su sabor. Sin embargo, algunos productos son sustratos de algunas reacciones que dan como resultado compuestos que influyen tanto en el sabor como en el aroma del queso madurado.¹⁵⁹

5. Péptidos

Los péptidos tienden a impartir sabores amargos al queso. Algunos péptidos en particular tienen este efecto bien definido, por ejemplo: Leu-Gli-Leu-Leu-Trp y Ala-Trp-Fen-Lis-Arg.¹⁶⁰ Las opiniones en cuanto al tamaño de los péptidos amargos varían, pero en general se está de acuerdo en que contienen una alta proporción de aminoácidos hidrofóbicos (Leu, Fen, Pro).¹⁶¹ De las diferentes fracciones de la caseína, se considera que la α_{S1} -caseína es la principal fuente de péptidos amargos.¹⁶² Los quesos en que estos péptidos se presentan muy probablemente contienen cepas deficientes en peptidasas, lo que permite la concentración de estos productos al no poder degradarlos en péptidos menores y aminoácidos.¹⁶⁰ Algunos péptidos generalmente considerados como amargos, fueron aislados por Mulder y se observó que realmente no evocaban tal sabor; mientras que algunos

otros parecían impartir al queso un sabor definido como básico, que podía mejorar o acentuar el sabor general del queso.¹⁶³

6. Aminoácidos

Los aminoácidos derivados de la proteína muy probablemente contribuyen en grado considerable al sabor de los quesos madurados por hongos. La caseína contiene una gran cantidad de aminoácidos y la gran mayoría de ellos han sido identificados en muestras de queso.¹⁶³ El grado de madurez es importante para determinar el contenido de aminoácidos, pues cuando el queso muestra un sabor bien definido se puede notar el nivel particularmente alto de algunos aminoácidos individuales. En el caso de los quesos madurados por hongos, los aminoácidos predominantes son: Glu, Leu, Val y aminoácidos básicos. La prolina, en cambio, muestra un nivel especialmente bajo o nulo en el Camembert. Los datos muestran que muchos aminoácidos se presentan en mayor concentración en el Roquefort que en el Camembert, aun cuando los quesos de ambos tipos tenían una intensidad similar de sabor. También se observó que aunque la mayoría de los aminoácidos presentan la misma proporción en el queso que en la estructura original de la caseína, la Tir y la Pro guardan una proporción diferente a la original. Algunos de los aminoácidos son a su vez degradados dando lugar a productos tanto volátiles como no volátiles, como son: amoníaco, aminas, aldehídos, alcoholes, fenoles, compuestos sulfurados y otros.¹⁶⁴

7. Amoníaco y aminas

En los quesos madurados por hongos el amoníaco resulta de la desaminación de los aminoácidos por parte de las levaduras oportunistas, y principalmente de *G. candidum*¹¹⁹ y *B. linens*,¹¹² los cuales, como se mencionó anteriormente, se presentan frecuentemente en la superficie de los quesos madurados por hongos, especialmente en los quesos suaves. A pesar de que no existen datos muy consistentes en cuanto al papel del amoníaco como componente del sabor, se sabe con certeza que es un elemento de gran importancia en el aroma del Camembert tradicional.

En los quesos madurados por hongos se han detectado aminas primarias volátiles y no volátiles,¹⁶⁵ como por ejemplo: etil-, butil-, isobutil-, isopentil-, dimetil-, dietil-, dipropil-, dibutil- y hexilamina, en concentraciones que fluctúan entre 0.64 y 1.3 mg/100 g.¹⁶⁶ Se cree que las aminas se producen mediante la descarboxilación de aminoácidos libres bajo condiciones de baja tensión de oxígeno, en las que la desaminación oxidativa es lenta.¹⁶⁶ El papel de las aminas es poco conocido en términos generales, sin embargo se conocen algunos detalles de algunas de ellas, como por ejemplo de la N-isobu-acetilamina, que ha sido identificada en el Camembert.¹⁶⁰ Este compuesto aislado tiene sabor amargo, por lo que se supone debe contribuir a este sabor particular en el queso.⁴⁶ Este compuesto se puede originar a partir del dipéptido Val-Gli, mediante descarboxilación y desaminación. Sin embargo, se ha demostrado que esta secuencia particular de aminoácidos no se presenta en las caseínas, por lo que la presencia de N-isobu-acetilamina en los queso madurados implicaría que ocurrió una reacción de transaminación.¹⁶⁷

8. Aldehídos y alcoholes

Se cree que la presencia de aldehídos en los quesos madurados por hongos es responsable de la presencia de sabores sucios. Estos compuestos son formados por la vía degradativa de Stecker. Esta vía incluye la reacción de un aminoácido con un grupo β -carbonilo, la cual es catalizada por las enzimas de *S. lactis*, específicamente la var. *maltigenes*. El aminoácido es desaminado y posteriormente descarboxilado por un compuesto dicarbonílico, para dar lugar a un aldehído. De esta manera es formado metional a partir de la metionina, y la valina da lugar al 2-metilpropanal,¹⁶⁶ que son aldehídos ampliamente reconocidos en los quesos madurados por hongos.

Estos compuestos, junto con el 3-metilbutanal, se han descrito como causantes de sabores desagradables no bien definidos cuando se presentan en niveles demasiado altos, pero también han sido identificados en quesos de buena calidad en los que sus concentraciones son bajas; confieren cierto sabor a malta en el queso.¹⁶⁸

Los aldehídos pueden ser reducidos y formar alcoholes primarios, que generalmente se presentan junto con los primeros. En el Camembert se han identificado los siguientes alcoholes: feniletanol, 2-metilpropanol y 3-metil-1-butanol.¹⁶⁶ En el Camembert tradicional se han descrito cantidades considerables de 2-feniletanol;¹⁶⁹ este producto tiene un agradable aroma a rosas. Alcanza una concentración máxima tras una semana de maduración y posteriormente disminuye.¹⁷⁰ Lee y Richard observaron que las levaduras pueden producir 2-feniletanol a partir de fenilalanina, sin embargo, *G. candidum* y *B. linens* no tienen esta capacidad.¹⁷¹ Es probable que este compuesto sea producido por las levaduras que se desarrollan al principio de la maduración, obteniéndose a partir de la degradación de la fenilalanina por la vía de Ehrlich-Neubauer, con el fenilpiruvato como producto intermediario.¹⁵⁶

Los valores promedio del nivel mínimo de detección (umbral de detección) de feniletanol en un sustrato de tipo cuajo son 7.6 ppm para el aroma y 9.0 ppm para el sabor. Los niveles de este producto que se encuentran en los quesos son ligeramente menores a los anteriores, pero corresponden a los niveles mínimos de detección de los catadores más sensibles.¹⁷⁰ Por lo tanto, este producto debe ser el responsable de la característica floral que algunos catadores pueden distinguir en el Camembert tradicional.¹⁷²

9. Compuestos sulfurados y fenoles

Los compuestos sulfurados se obtienen a partir de la descomposición de aminoácidos que contienen azufre: cisteína y metionina, y son de particular interés ya que generalmente contribuyen de manera importante al aroma y sabor de los quesos madurados. En particular, producen la nota a ajo que se presenta claramente en el Camembert tradicional.¹⁷³ En el Camembert típico se han encontrado 2,4-ditiapentano, 2,4,5-tritiohexano y 3-metiltio-2,4-ditiapentano, además de sulfito de dimetilo, metilsulfito y 3-metiltiopropanol, que también se presentan en otros quesos y causan la nota básica del queso.¹⁷⁴ Se ha descrito que *P. camembertii* produce sulfito de hidrógeno, sulfito de dimetilo, metional y metanotiol a partir de metionina mediante una combinación de oxidación, desaminación y desmetilación.¹⁷⁵ El metional tiene un sabor similar a pan/papa y se considera un portador de aroma, contribuyendo al aroma total del queso.¹⁷⁶ El metional puede a su vez ser degradado a sulfito de dimetilo, el cual presenta un sabor similar a cebolla/tomate en dilución.¹⁷⁷

El metanotiol se presenta en el Camembert principalmente cuando crecen en la superficie B. linens o G. candidum. Se han aislado cepas de B. linens a partir de productos lácticos y se ha observado que producen metanotiol,¹⁷⁸ pues estas bacterias tienen una desmetilasa que actúa sobre la metionina para dar lugar a este compuesto.¹⁷³ Así también, se ha demostrado que G. candidum produce metanotiol además de otros compuestos sulfurados.¹⁷⁹ No se ha demostrado una contribución directa del metanotiol en el aroma del Camembert, sin embargo, se sabe que varios compuestos sulfurados se forman a partir de este producto a través de reacciones enzimáticas,¹⁶⁷ como por ejemplo la que se lleva a cabo con el formaldehído que da como producto el bis-(metil)-metano, el cual se considera importante en el perfil aromático del queso.⁵⁹ El metanotiol puede ser también convertido parcialmente en sulfito de dimetilo y polisulfitos mayores, por oxidación, o bien puede ser esterificado por ácidos grasos libres formando metiltoésteres.¹⁸⁰ La esterificación de ácidos grasos de cadena corta con metanotiol llevada a cabo por la microbiota superficial genera tioésteres con aromas similares al del queso.¹⁸⁰ Los metiltoésteres también tienen otras propiedades organolépticas en los quesos madurados por hongos. El metanotiol es liposoluble y prácticamente no hidrosoluble. Al usar leche sin grasa para la elaboración de quesos madurados por hongos se pierde prácticamente todo el contenido de metanotiol que pudiera formarse en la maduración, lo cual contribuye a la pobreza de sabor de los quesos hechos con leche descremada.¹⁸¹

En cuanto a los fenoles encontrados en los quesos madurados por hongos, se puede decir poco. Por un lado, se sabe que el fenol, el p-cresol y el indol tienen cierta importancia como elementos del sabor de estos quesos, pero son pocos los detalles que se pueden precisar. El fenol es formado a partir de la degradación de la tirosina, por la pérdida de un grupo de alanina. De manera similar, el indol se forma a partir del triptófano; este último compuesto tiene un aroma floral dulce agudo en dilución, pero cuando está concentrado tiene un aroma repulsivo, por lo cual puede causar sabores indeseables a concentraciones inadecuadas.¹⁷⁷

10. Pirazinas

Las pirazinas son compuestos orgánicos cíclicos definidos como diazinas 1-4 y representados como un híbrido de resonancia de la estructura canónica (Fig. 17). Estos compuestos se presentan en la naturaleza en cantidades relativamente pequeñas, pero se sabe que se presentan en una gran variedad de alimentos, contribuyendo tanto a su sabor como a su olor. La gama de productos en los que se presentan puede ir desde semillas, como las del café, el cacao o el cacahuete, en frutos, como chicharos verdes y papas, hasta productos de origen tanto vegetal como animal, como por ejemplo, en cortes de carne de res, en productos fermentados de soya, en el té negro y en varios quesos, como por ejemplo el Emmentaler y el Gouda. Además se han reportado a varias especies de Aspergillus y de Streptomyces como productoras de pirazinas, así como a algunas levaduras, como por ejemplo Candida pulcherrima (Linder) Windisch.¹⁸²

La presencia de pirazinas es bien conocida en los quesos madurados por hongos, y parece que estos compuestos contribuyen al sabor nuez/pimienta del queso, además de que afectan la calidad general del mismo. La 2-metoxi-3-isopropilpirazina (MIP) (Tabla 10) y las alquilpirazinas son de una importancia particular, ya que se reconoce a la MIP como responsable de una nota moho/tierra en el sabor del queso, así como de un aroma mohoso similar a chicharo o papa cruda, especialmente en los quesos más maduros. El bajo valor umbral de este compuesto (0.02 ppb) hace pensar que son cantidades muy pequeñas las que contribuyen al sabor común del Camembert y del Brie, mientras que el exceso de este producto fácilmente contribuiría al sabor defectuoso a tierra/ champiñón que algunas veces presenta el Camembert francés.⁴⁶

VII. PROBLEMAS MICROBIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DURANTE Y DESPUÉS DE LA MADURACIÓN

1. Problemas microbiológicos

Un problema durante la maduración del Camembert es la contaminación por P. roquefortii en la superficie de este queso. Esta contaminación se controla efectivamente usando concentraciones altas de esporas de P. camembertii en el queso, además de la fumigación de las repisas y del equipo.⁴⁴ Sin embargo, un problema más frecuente que el anterior es la presencia de un moho de color negro, Mucor sp., que causa una apariencia indeseable en la superficie blanca del queso; este defecto es conocido como "pelo de gato".¹⁸³ Este moho se presenta normalmente en la superficie del queso Tome de Savoie, pero en el Camembert puede ser controlado por la adición de NaCl, aireación completa de las ruedas de queso y fumigación. A pesar de todo esto, el hongo es muy persistente y puede reaparecer en poco tiempo, aunque generalmente lo hará en una escala menor.⁴⁴ En ocasiones se presenta en estos quesos un crecimiento excesivo de G. candidum, causado por un salado deficiente y un drenado igualmente insuficiente, que ayudan al desarrollo de este hongo. El desarrollo incontrolado de G. candidum tiene efectos indeseables sobre el Camembert, ya que, por una parte, impide la implantación de P. camembertii, y, por otra, causa defectos en la apariencia y el gusto del queso, que en conjunto son conocidos con el nombre de "piel de sapo".¹⁸³

En algunos casos, la leche con que se elaboran los quesos está altamente contaminada con bacterias psicrótrofas, lo cual causa defectos organolépticos. Esto se debe a que la actividad lipasa de las bacterias trae como consecuencia el incremento en la lipólisis, causando sabor rancio y en ocasiones también un sabor amargo.¹⁸⁴ Por otro lado, es difícil controlar la microbiota coliforme en el Camembert. Al principio de la elaboración del queso, el proceso de acidificación destruye una gran parte de estas bacterias, pero cuando el pH se eleva en la maduración, las bacterias se reproducen nuevamente resultando, en algunos casos, en altos números de coliformes en el queso.¹⁸⁵

Por último, se debe tomar en cuenta también que un crecimiento demasiado abundante de P. camembertii trae como consecuencia un grado de proteólisis excesivo, lo cual generalmente conlleva defectos en la acentuación del sabor amargo en el queso; el crecimiento excesivo de este organismo puede a su vez limitar el crecimiento de G. candidum.¹⁸⁶ Como se mencionó anteriormente, algunas cepas de G. candidum mejoran claramente el sabor y el aroma de los quesos pasteurizados del tipo Camembert. Su crecimiento controlado resulta en un sabor más típico, muy cercano al del Camembert tradicional.¹⁷⁹

P. roquefortii es un hongo dominante, y la experiencia en la elaboración de quesos lo considera más fuerte que el hongo blanco P. camembertii; esto procede de la observación de que en cualquier oportunidad que se presente al primero, lo aprovechará para conquistar el terreno del segundo, tanto en los quesos como en los mismos cultivos.¹⁸⁷ También en el Roquefort y sus tipos relacionados, el crecimiento del hongo es un factor crucial.

Si el crecimiento del organismo es demasiado extenso o demasiado limitado, el aroma y el sabor finales serán tan acentuados que son indeseables, o demasiado débiles.¹⁸⁸ Los defectos más comunes de los quesos de venas azules son el crecimiento excesivo o insuficiente del moho y el crecimiento excesivo de B. linens.³⁵ El crecimiento de P. roquefortii puede ser limitado por la concentración de

NaCl en el medio, que puede ser mayor a 6-8% en la fase líquida en los quesos de vena azul; la tolerancia a dichas concentraciones varía entre las diferentes cepas.¹⁸⁹ Se sabe también que el proceso de salado, cuando es demasiado prolongado, causa un decremento en las tasas de proteólisis y lipólisis.^{60,127} Además de los efectos sobre P. roquefortii, la concentración de sal influye en la implantación de micrococos y levaduras en la superficie del Roquefort.⁵⁶

2. Problemas bioquímicos - micotoxinas.

Mientras que P. camembertii produce sustancias como el ergosterol, que es un precursor de la vitamina D, y en los quesos de vena azul se presentan sustancias como la niacina y la vitamina B6.¹⁵² como otros hongos, también P. roquefortii y P. camembertii pueden producir una serie de sustancias tóxicas conocidas como micotoxinas. Las cepas de P. roquefortii pueden producir ácido penicílico, roquefortina, isofumigaclavinas A y B, toxina PR, ácido micofenólico y patulina; P. camembertii produce además ácido ciclopiazónico.¹⁹⁰ Sin embargo, la patulina y el ácido penicílico no han sido hallados en quesos,¹⁹¹ como tampoco la toxina PR, la cual es inestable bajo las condiciones del cuajo.¹⁹² Los metabolitos fúngicos que pueden ser hallados en los quesos son: roquefortina,¹⁹³ isofumigaclavina A,¹⁹³ ácido micofenólico¹⁹⁴ y ácido ciclopiazónico.¹⁹⁵

Le Bars, (1979)¹⁹⁵ aisló 20 cepas de P. camembertii a partir de diferentes quesos comerciales, e investigó en ellas su capacidad para producir ácido ciclopiazónico. Encontró que todas las cepas producían este ácido en dos medios de cultivo diferentes a 25, 13 y 4 °C. Notó que la producción del compuesto dependía fuertemente de la cepa y de los parámetros ambientales: medio, temperatura y tiempo de incubación. Esta micotoxina fue encontrada en la corteza con la siguiente proporción: 0.05 a 0.1 g/g en tres muestras, 0.1-0.2 g/g en cinco muestras, y 0.4, 1.0 y 1.5 g/g en otras tres muestras; sin embargo, no se detectó en la parte interna del queso. Al considerar la toxicidad de la micotoxina, se calculó que las dosis de ácido ciclopiazónico que se ingieren eventualmente por los consumidores - que en las muestras más contaminadas equivaldría a 3 ó 4 g. por una porción (aproximadamente un octavo de un queso Camembert) - son muy bajas en comparación con la dosis letal al 50% en ratas (36 mg/Kg *per os*). Por otra parte, se debe considerar que la producción de las toxinas se presenta en su mayoría a temperaturas demasiado elevadas comparadas a las temperaturas de refrigeración. El estudio demostró que son elementos necesarios para una contaminación natural en los quesos una muy alta fuerza y tasa toxigénicas de las cepas, y que la distribución de la capacidad toxigénica hace perfectamente posible escoger cepas pobres en esta característica.¹⁹⁵

El ácido micofenólico (MPA), una de las micotoxinas producidas por P. roquefortii, ha sido identificado como uno de los metabolitos responsables de la inhibición del desarrollo de embriones de pollo y de cultivos celulares. Sin embargo, la toxicidad de este producto parece ser baja para los mamíferos.¹⁹⁶ En los mamíferos, el MPA es absorbido rápidamente por el tracto digestivo, y después de su conjugación es excretado como MPA-glucurónido en la orina.¹⁹⁷ Las dosis letales al 50% *per os* son de 2,500 mg/Kg en ratas y de 700 mg/Kg en ratones. En conejos, dosis orales diarias de 80 y 320 mg/Kg durante un año no dan resultados aparentes de toxicidad. Sin embargo, en ratas la administración oral de dosis diarias del orden de 30 mg/Kg causan anemia y muerte después de varias semanas. Los monos presentan dolores abdominales, diarrea con sangre y anemia después de dos semanas de alimentarse con dosis de 150 mg/Kg.¹⁹⁸ Lafont y su grupo¹⁹⁶ aislaron 16 cepas de P. roquefortii a partir de diferentes quesos de vena azul de distintas procedencias de Europa y estudiaron en ellas la producción de MPA. Todas las cepas del estudio produjeron la toxina, pero solamente en cuatro de ellas se presentó en cantidades relativamente grandes. Tres de estas cepas se

cultivaron en cuatro medios diferentes a 15°C. Los niveles de MPA fueron similares en los cultivos que crecieron en los medios sintéticos y semisintéticos, pero fueron mucho menores cuando el sustrato fue cuajo de leche (Tabla 11) ¹⁹⁶. Si asumimos un nivel de "no efecto" para las células humanas a 0.5 g /ml in vitro (aprox. 0.5 mg/Kg in vivo), un humano de 70 Kg. podría consumir 35 mg de MPA. Esto equivale al consumo de 7 Kg de queso de vena azul que contenga 5 mg de MPA/Kg, el valor más alto detectado en los quesos del mercado alemán. ¹⁹⁴

Como conclusión, se puede decir que, considerando los bajos niveles (ppm) de las micotoxinas en general, y su actividad biológica, se ha concluido que no existe riesgo alguno para la salud humana, aun cuando se consuman grandes cantidades de queso. A pesar de esto, algunos autores aún consideran prudente el seguir realizando continuamente estudios toxicológicos. ¹⁹⁰

ESTA TESIS
SALIO DE LA
BIBLIOTECA

BIBLIOGRAFIA:

1. Pederson, C.S.. 1979. Microbiology of Food Fermentations. AVI Publishing Co. , Westport. En: Roberts, T.A. y F.A. Skinner. 1983. Food Microbiology: Advances and Prospects. Academic Press, Londres, 394 pp.
2. Roberts, T.A. y F.A. Skinner. 1983. Food Microbiology: Advances and Prospects. Academic Press, Londres, p. 257.
3. Ayres, J.C., J.O. Mundt y W.E. Sandline. 1980. Microbiology of Foods. Freeman, San Francisco, 708 pp.
4. Ayres, J.C. et al. 1980. (3.) p. 374.
5. Fox, P.F. (Ed.) 1987. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Vol. I. Elsevier, Londres, 400 pp.
6. Ayres, J.C. et al.. 1980. (3.) p. 375.
7. Fox, P.F. 1987 I. (5.) p. 29.
8. Kosikowski, F. 1982. Cheese and Fermented Milk Foods. Kosik. & Assoc, Nueva York, p. 90.
9. Ayres, J.C. et al. 1980. (3.) p.341.
10. Ayres, J.C. et al. 1980. (3.) p.342.
11. Roberts, T.A. y Skinner, F.A. 1983. (2.) p. 258.
12. Ayres, J.C. et al. 1980. (3.) p.343.
13. Ayres, J.C. et al. 1980. (3.) p.344.
14. Dartey, C.K. y Kinsella, J.E. 1973a. J. Agric.Food Chem. 21,4:721.
15. Peppler, H. y G. Reed. Enzymes in Food and Feed Processing. en: Kennedy, J. (Ed.). 1987. Biotechnology. Vol. 7a. Enzyme Technology. UHG.
16. Ayres, J.C. et al. 1980. (3.) p.345.
17. Kosikowski, F. 1982. (8.) p. 91.
18. Kosikowski, F. 1982. (8.) p. 107.
19. Fox, P.F. 1987 I. (5.) p. 17.
20. Kosikowski, F. 1982. (8.) p. 108.
21. Schlessler, J.E., Schmidt S.J. y Speckman, R. 1992. J. Dairy Sci. 75, 1755-59.
22. Reys, A. Bacterial Surface-Ripened Cheeses. En: Fox, P.F. (Ed.). 1987. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Vol. II. Elsevier, Londres, pp. 151-184.
23. González del Llano, D. et al. 1990. J. Dairy Sci. 73, 1677.
24. Reys, A., 1987. (22.) p. 152.
25. Reys, A., 1987. (22.) p. 155.
26. Kosikowski, F. 1982. (8.) p. 317.
27. Gripon, J.C. Mould-Ripened Cheeses. En: Fox, P.F. (ed.) 1987. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Elsevier, Londres, pp. 121-149.
28. Kosikowski, F. 1982. (8.) p. 329.
29. Pitt, J.I. 1979. The Genus Penicillium and its Teleomorphic States. Eupenicillium & Talaromyces. Academic Press, Londres, pp. 560.
30. Moreau, C. 1980. Lait 60, 254.
31. Lenoir, J. y Choisy, C. 1970. Lait 51, 138.
32. Tournour, C.1982. Proc. 21st. Int. Dairy Congr., Moscow, Vol. 1, Book I, p. 380. En: Gripon, J.C. Mould-Ripened Cheeses. En: Fox, P.F. (ed.) 1987. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Elsevier, Londres, pp. 121-149.
33. Kosikowski, F. 1982 (8.) p. 333.
34. Kosikowski, F. 1982 (8.) p. 431.
35. Seth, R.J.y R.K.Robinson. Factors Contributing to the Flavour Characteristics of Mould Ripen Cheeses. En: Robinson, R.K. (Ed.). 1988. Developments in Food Microbiology. Vol. IV. Elsevier, Londres,

pp. 23-46.

36. Norris, J.R. y G.L. Pettiper. 1987. Essays of Agricultural and Food Microbiology: Soft Cheeses and Blue-Veined Cheeses. J. Wiley & Sons. Nueva York, 448 pp.
37. Kosikowski, F. 1982. (8.) p. 318.
38. Kosikowski, F. 1982. (8.) p. 319.
39. Kosikowski, F. 1982. (8.) p. 321.
40. Marcos, A. Spanish & Portuguese Cheese Varieties. en: Fox, P.F.(Ed.). 1987. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Vol. II. Elsevier, Londres, pp. 185-219.
41. Nelson, J.H. 1970. J. Agr. Food Chem. 18,4. p. 567.
42. Kosikowski, F. 1982. (8.) p. 324.
43. Kosikowski, F. 1982. (8.) p. 326.
44. Mocquot, G. 1955. J. Soc. of Dairy Tech. 8,17. en: Kosikowski, F. 1982. (8.)
45. Ayres, J.C. et al. 1980. (3.) p. 387.
46. Karahadian, C., Josephson, D.B. y Lindsay, R.C. 1985. J. Agric. Food Chem. 33, 339.
47. Lenoir, J. 1963. Lait. 43, 262.
48. Schmidt, J.L. y Lenoir, J. 1980. Lait. 60, 272.
49. Seth, R.J. y R. K. Robinson. 1988. (35.) p. 31.
50. Richard, J. y Zadi, H. 1983. Lait. 63,25.
51. Richard, J. 1984. Lait. 64, 496.
52. Schmidt, J.L. y Lenoir, J. 1978. Lait. 58, 335.
53. Devoyod, J.J., Bret, G. y Auclair, J. 1968. Lait. 48, 613.
54. Devoyod, J.J. y Sponem, D. 1970. Lait. 50, 524.
55. Devoyod, J.J. 1970. Lait. 50, 277. en: Gripon, J.C., 1987. (27.)
56. Devoyod, J.J. 1969. Lait. 49, 20.
57. Trien-Cout, P. y Gripon, J.C. 1983. Lait. 63, 116.
58. Kinsella, J.E. y Hwang, D. 1976. Biotech. Bioengineer. 18, 927.
59. Law, B.A., Castanon, M.J. & Sharpe, M.E. 1976. J. Dairy Res. 43, 301.
60. Hewedi, M.M. y Fox, P.F. 1984. Milchwissenschaft. 39, 198.
61. Gohino, M. y Fox, P.F. 1982. Milchwissenschaft. 37, 72.
62. Ismail, A. y Hanson, A.A. 1972. Milchwissenschaft. 27, 556.
63. Lenoir, J. C.R. 1962. Acad. Agric. 48, 160.
64. Do Ngoc, M., Lenoir, J. y Choisy, C. 1971. Revue Latiere Francaise. 288, 447.
65. Marcos, A., Esteban, M.A., Leon, F. y Fernandes-Salguero. 1979. J. Dairy Sci. 62, 892.
66. Gripon, J.C., Desmazeaud, M.J., Le Bars, D. y J.L. Bergere. 1977. J. Dairy Sci. 60, 1532.
67. Creamer, L.K. 1975. J. Dairy Sci. 58, 287.
68. O'Keefe, R.B., Fox, P.F. & Daly C. 1976. J. Dairy Res. 43, 97.
69. Noomen, A. 1978. Neth. Milk Dairy J. 32, 49. en: Gripon, J.C., 1987. (27.)
70. Creamer, L.K. 1971. New Zealand J. Dairy Sci. Technol. 6, 91. en: Marcos et al., 1979. (66.)
71. Pelliser, J.P., J.C. Mercier y B. Ribadeau Dumas. 1974. Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys. 14, 343.
72. Creamer, L.K. 1976. New Zealand J. Dairy Sci. Technol. 11, 30. en: Marcos et al., 1979. (66.)
73. Trien-Cout, P. y Gripon, J.C. 1982. J. Dairy Res. 49, 501.
74. Trien-Cout, P., Archieri-Haze, M.J. y Gripon, J.C. 1982. J. Dairy Res. 49, 487.
75. Trien-Cout, P., Archieri-Haze, M.J. y Gripon, J.C. 1982. Lait. 62, 234.
76. Visser, F.M.W. 1977. Neth. Milk Dairy J. 31, 210.
77. Noomen, A. 1978. Neth. Milk Dairy J. 32, 26.
78. Eigel, W.N. 1977. J. Dairy Sci. 60, 1399-1403.
79. Law, B.A. y Kolstad, J. 1983. Antonie van Leeuwenhoek. 49, 225. en: Gripon, J.C., 1987. (27.)
80. Desmazeaud, M.J. y Zevaco, C. 1976. Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys. 16, 851.
81. Zevaco, C. y Desmazeaud, M.J. 1980. J. Dairy Sci. 63, 15.
82. Gueguen, M. y Lenoir, J. 1976. Lait. 56, 439.
- 83.
84. Vassal, Com. Pers.; Gripon, J.C., 1987, (27.) p. 130.
85. Desmazeaud, M.J. y Devoyod, J.J. 1974. Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys. 14, 327.

86. Friedman, M.E., Nelson, W.O. y Wood, W.A. 1953. J. Dairy Sci. **36**, 1124.
87. Foissy, H. 1978 Milchwissenschaft **33**, 221.
88. Torgersen, H. y Sorhaug, T. 1978. FEMS Microb. Lett. **4**, 151.
89. Gripon, J.C., 1987. (27.) p. 131.
90. Desmazeaud, M.J., Gripon, J.C., Le Bars, D. y Berquere, J.L. 1976 Lait **56**, 379.
91. Le Bars, D. y Gripon, J.C. 1981. J. Dairy Res. **48**, 479.
92. Gripon, J.C. 1977. Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys. **17**, 283.
93. Gripon, J.C. 1977. Biochimie **59**, 679.
94. Gripon, J.C. y Debest, B. 1976. Lait **56**, 423.
95. Lenoir, J. y Choisy, C. 1970. Lait **51**, 138. en: Gripon, J.C., 1987. (27.)
96. Kinsella, J.E. y Hwang, D.M. 1976. CRC Crit. Rev. Food. Sci. Nutr. **8**, 191.
97. Lenoir, J. Auberger, B. y Gripon, J.C. 1979. Lait **59**, 244.
98. Lenoir, J. y Auberger, B. 1982. Proc. 21st. Int. Dairy Congr., Moskow, Vol1(2), p.335. en: Gripon, J.C., 1987. (27.)
99. Gripon, J.C. y Hermier, J. 1974. Biochimie **56**, 1323.
100. Lenoir, J. y Auberger, B. 1977. Lait **57**, 471.
101. Gripon, J.C., Auberger, B. y Lenoir, J. 1980. Int. J. Biochem. **12**, 451.
102. Inaura, T. 1960. J. Agr. Chem. Soc. **34**, 375.
103. Takafuji, S. y Yoshioka, Y. 1982. Reports of Research Laboratory, Snow Brand Milk Products Co. Ltd. **78**. en: Gripon, J.C., 1987. (27.)
104. Le Bars, D. y Gripon, J.C. 1981. J. Dairy Res. **48**, 479.
105. Lenoir, J. 1984. IDF Bulletin, Vol. 171, p. 3 en: Gripon, J.C., 1987. (27.)
106. Rosseau, M. 1984. Milchwissenschaft **39**, 129.
107. Paquet, J. y Gripon, J.C. 1980. Milchwissenschaft **35**, 72.
108. Ischima, E., Takeuchi, M., Yamamoto, K., Sano, Y. y T. Kikuchi. 1978. Current Microb. **1**, 95.
109. Ahiko, K., Iwasawa, S., Ueda, M. y Miyata, N. 1981. Reports of Research Laboratory, Snow Brand Milk Products Co. Ltd. Vol. 77 p. 127. en: Gripon, J.C., 1987. (27.)
110. Auberger, B., Bontals, M. y Lenoir, J. 1982. Proc. 21st. Int. Dairy Congr., Moscow, Vol 1(2), p. 276. en: Gripon, J.C., 1987. (27.)
111. Fuke, Y., Kaminogawa, S., Matsuoka, H. y K. Yamauchi. 1988. J. Dairy Sci. **71**, 1423.
112. Hemme, D., Bouillanne, C., Metro, F. y Desmazes, M.J. 1982. Science des Aliments **2**, 113.
113. Cecchi, L. y Resmini, P. 1972. Scienza et Technica Lattiero-Casearia **23**, 389.
114. Colonna, P. y Adda, J. 1976. Lait **56**, 143.
115. Sen, N.P. 1969. J. Food Sci. **34**, 22.
116. Sharpe, M.E., Law, B.A., Phillips, B.A. y Pitcher, D.G. 1977. J. Gen. Microbiol. **101**, 345.
117. Ferchichi, M., Hemme, D., Nardi, M. y N. Pamboukjian. 1985. J. gen Microb. **131**, 715.
118. Cher, A., Dauphin, G., Kergomard, A., Dumont, J.P. y Adda, J. 1979. Agric. Biol. Chem. **43**, 1783. En: Law, B.A., 1984. (79.)
119. Greenberg, R.S. y Ledford, R.A. 1979. J. Dairy Sci. **62**, 368.
120. Lee, C.W., Lucas, S. y Desm. 1985. FEMS Microb. Lett. **26**, 201.
121. Lee, C.W. y Desm. 1985. Arch. Microbiol. **140**, 331.
122. Van Belle, M., Vervack, W. y Foulon, M. 1978. Lait **58**, 246.
123. A.H. Woo, S. Kollodge y R.C. Lindsay. 1984. J. Dairy Sci. **67**, 874.
124. Pradel, G. Pers. Comm.: Gripon, J.C., 1987. (27.) p. 141.
125. Anderson, D.F. y Day, E.A. 1965. J. Dairy Sci. **48**, 248.
126. Godinho, M. & Fox, P.F. 1981. Milchwissenschaft **36**, 205. en: Law, B.A. 1984 (79.)
127. Godinho, M. & Fox, P.F. 1981. Milchwissenschaft **36**, 476.
128. Morris, H.A., Jerski, J.J., Combs, W.B. y Kuramoto, S. 1963. J. Dairy Sci. **46**, 1.
129. King, R.D. y Clegg, G.H. 1979. J. Sci. Food Agric. **30**, 197.
130. Kuzdzal, W. and Kuzdzal-Savoie, S. 1966. Proc. 17th Int. Dairy Congr., Munich, Vol D2, p. 335. en: Gripon, J.C., 1987. (27.)
131. Kuzdzal-Savoie, S. y Kuzdzal, W. 1966. Techn. Lait **14**, 17.
132. Lamberet, G. y Lenoir, J. 1976. Lait **56**, 622.

133. Lamberet, G. y Lpez, M. 1982. Proc. 21st Int. Dairy Congr., Moscow, Vol. 1(1), p. 499.
134. Kman, I.M., Chandan, R.C. Y Shannani, K.M. 1966. J. Dairy Sci. **49**, 700.
135. Morris, H.A. y Jereski, J.J. 1953. J. Dairy Sci. **36**, 1285.
136. Eitenmiller, R.R., Vakil, J.R. y Shannani, K.M. 1970. J. Food Sci. **35**, 130.
137. Lamberet, G. y Menassa, A. 1983. J. Dairy Res. **50**, 459.
138. Lamberet, G. y Menassa, A. 1983. Lait **63**, 33.
139. Gripon, J.C., 1987. (27.) p. 133.
140. Franke, W., Platzcek, A. y Eichhorn, G. 1962. Arch. Mikrobiol. **41**, 154. en: Dartey, C.K. y Kinsella, J.E. 1973a. (14.)
141. Lawrence, R.C. 1966. J. Gen. Microbiol. **44**, 393.
142. Lawrence, R.C. y Hawke, J.C. 1968. J. Gen. Microbiol. **51**, 289.
143. Dartey, C.K. y Kinsella, J.E. 1973a. J. Agric. Food Chem. **21**(4), 721.
144. Pressman, B.C. y Lardy, H.A. 1956. Biochem. Biophys. **21**, 458. en: King, R.D. y Clegg, G.H. 1979. (127.)
145. Dartey, C.K. y Kinsella, J.E. 1973b. J. Agric. Food Chem. **21**(6), 933.
146. Dwivedi, B.K. y Kinsella, J.E. 1974. J. Food Sci. **39**, 83.
147. Dartey, C.K. y Kinsella, J.E. 1971. J. Agric. Food Chem. **19** (4), 771.
148. Fan, T.Y., Hwang, D.H. y Kinsella, J.E. 1976. J. Agric. Food Chem. **24** (3), 443.
149. Berner, G. 1970. Milchwissenschaft. **25**, 275.
150. Berner, G. 1971. Milchwissenschaft. **26**, 685.
151. Markwalder, H.U. 1982. Lebensm. Wiss. u- Technol. **15**, 68.
152. Gripon, J.C., 1987. (27.) p. 135.
153. Le Graet, Y., Lepienne, A., Brule, G. y Ducruet, P. 1983. Lait **63**, 317.
154. Jolly, R.C. y Kosikowski, F.V. 1975. J. Dairy Sci. **58**, 846.
155. Lamberet, G., Auberger, B., Canteri, C. Y Lenoir, J. 1982. Revue Laitiere Francaise. **406**, 13.
156. Anderson, D.F. y Day, E.A. 1966. J. Agric. Food Chem. **14**, 241.
157. Seth, R.J. y R.K. Robinson. 1988. (35.) p. 34.
158. Hawke, J.C. 1966. J. Dairy Res. **33**, 225.
159. Seth, R.J. y R.K. Robinson. 1988. (35.) p. 35.
160. Dumont, J.P. y Adda, J. 1979. en: Seth, R.J. y R.K. Robinson. 1988. (35.)
161. Law, B.A. 1984. (79.) p. 203.
162. Adda, J., Gripon, J.C. y L. Vassal. 1982. Food Chemistry. **9**, 115.
163. Mulder, H. 1952. Neth. Milk and Dairy J. **6**, 157. en: Seth, R.J. y R.K. Robinson. 1988. (35.)
164. Kosikowski, F.V. y Dahlberg, A.C. 1954. J. Dairy Sci. **37**, 167.
165. Margalith, P.Z. 1981. Flavour Microbiology. Charles C. Thomas, III., USA. en: Seth, R.J. y R.K. Robinson. 1988. (35.)
166. Seth, R.J. y R.K. Robinson. 1988. (35.) p. 39.
167. Adda, J., Gripon y Vassal, L. 1982. Food Chemistry. **9**, 115.
168. Forss, D.A. 1979. J. Dairy Res. **46**, 691.
169. Jolly, R.C. y Kosikowski, F.V. 1975. J. Food Sci. **40**, 285.
170. Roger, Degas y Gripon, datos no publ. en: Gripon, J.C. 1987. (27.)
171. Lee, C.W. y Richard, J. 1984. J. Dairy Res. **51**, 461.
172. Seth, R.J. y R.K. Robinson. 1988. (35.) p. 40.
173. Gripon, J.C., 1987. (27.) p. 138.
174. Adda, J. en: Eck, A. (Ed.) 1984. Le Fromage. Lavoisier, Paris, p. 330.
175. Seth, R.J. y R.K. Robinson. 1988. (35.) p. 41
176. Scott, R. 1981. Cheesemaking Practice. Applied Science, Londres. en: Seth, R.J. y R.K. Robinson. 1988. (35.)
177. Parliment, T.H., Kolor, G.M. y Rizzo, D.J. 1982. J. Agric. Food Chem. **30**, 1006.
178. Cuer, A., Dauphin, G., Kergomard A., Dumont, J.P., y Adda, J. 1979. Appl. Microbiol. **38**, 332.
179. Mourgues, R., Bergere, J.L. y Vassal, L. 1983. La Technique Laitiere. **978**, 11.
180. Cuer, A., Dauphin, G., Kergomard, A.R., Dumont, J.P. y Adda, J. 1979. Agric. Biol. Chem. **43** (7), 1783.
181. Seth, R.J. y R.K. Robinson. 1988. (35.) p. 42.

182. Barlin, G.B. 1982. The Pirazines. Interscience. NY. 908 pp.
183. Gripon, J.C., 1987. (27.) p. 142.
184. Dumont, J.P., Delespaul, g., Mignot, B. y Adda, J. 1977. Lait, 57, 619.
185. Mourgues, R., Vassal, L., Auclair, J., Mocquot, G. y Andeweghe, J. 1977. Lait, 57, 131.
186. Gripon, J.C., 1987. (27.) p. 143.
187. Kosikowski, F. 1982. (8.) P. 433.
188. Gripon, J.C. 1987. (27.) p. 141.
189. Godinho, M. y Fox, P.F. 1981. Milchwissenschaft, 36, 205.
190. Norris, J.R. y G.L. Pettiper. 1987. (36.) p. 159.
191. Engel, G. y Prokopek, D. 1980. Milchwissenschaft, 35, 218.
192. Piva, M.T., Guiraud, J., Crouzet, J. y Galzy, P. 1976. Lait, 56, 397.
193. Scott, P.M. y Kennedy, B.P.C. 1976. J. Agric. Food Chem. 24, 865.
194. Engel, G., Von Milczewski, K.E., Prokopek, D. y Teuber, M. 1982. Appl. Environ. Microbiol. 43, 1034.
195. Le Bars. 1979. Appl. Environ. Microb. 38, 1052
196. Lafont, p., J.P. Debeaupuis, M. Gaillardin y J. Payen. 1979. Appl. Environ. Microbiol. 37 (3), 365.
197. Sweeney, M.J., D.H. Hoffmann y M.A. Estermann. 1972. Cancer Res. 32, 1803.
198. Wilson, B.J., 1971 Miscellaneous Penicillium Toxins, pp. 459-521. Ciegler, A., S. Kadis y S.J. Aji (Eds.) Microbial toxins. Vol. VI Academic Press Inc. New York, 700 pp.

Tabla 1. Composición de la leche de vaca como materia prima para el queso.³⁵

<u>Macrocomponente</u>	<u>% Aprox.</u>	<u>Microcomponentes</u>
Grasa	3.75	Algunos diglicéridos, principalmente triglicéridos.
Lípidos	0.05	Lecitina, cefalina, esfingomielina.
Proteínas	3.38	Caseínas 2.78%. Proteínas del suero 0.60 %.
Lactosa	5.0	Azúcar de la leche.
Sales	0.9	Calcio, Magnesio, Sodio, Potasio, Fosfatos, Citratos, Cloruros, Sulfatos.

Tabla 2. Composición del agar de Czapek.³³

Componentes	Porcentaje
Sacarosa	4.00
Sulfato de magnesio	0.05
Fosfato de potasio (KH_2PO_4)	0.10
Cloruro de Potasio	0.05
Nitrato de sodio	0.30
Agar (Bacto)	1.50

Tabla 3. Características generales de los quesos madurados por hongos más importantes.

Queso	Peso Aproximado lbs/grs	Características
Roquefort	4.5 - 5.0 2,043 - 2,270	Queso de leche de oveja, madurado en las cuevas de Roquefort, Francia. Venas azules sobre fondo blanco.
Stilton	12 - 15 5,450 - 6,810	Leche de vaca. Origen: Inglaterra. Vena verde-azul sobre fondo blanco.
Gorgonzola	14 - 30 6,350 - 13,620	Leche de vaca. Origen: Valle de Po, Italia. Vena verde-azul en fondo ligeramente amarillo.
Azul	4.5 - 5.0 2,043 - 2,270	Leche de vaca. Elaborado en Francia, Dinamarca, E.U.A. y Argentina. Vena Azul en fondo blanco o ligeramente amarillo.
Camembert	0.5 227	Leche de vaca. Hecho en Normandía, Picardy, Francia, también en E.U.A., Dinamarca y Alemania. Afelpado blanco en la superficie del queso.
Brie	4 1816	Leche de vaca, producido a 30 millas al este de París. Afelpado blanco y rojizo en la superficie muy amplia del queso (en diámetro).

Tabla 4. Composición típica de los quesos madurados por hongos. ³⁴

	<u>Azul</u> %	<u>Camembert</u> %
Grasa	30.4	27.0
Humedad	41.5	50.0
Proteína	21.3	19.0
Sal	4.0	2.3
Otros	2.3	1.7

Tabla 5. Composición comparativa de las diferentes regiones electroforéticas de las caseínas de varios quesos. ⁶⁵

	Caseínas (% de densidad óptica total)					
	Pre- α_s	α_s	β	γ_1	γ_2	γ_3
Cheddar	24	20	11	21	8	16
Edam	12	22	10	30	9	16
Bola	11	11	39	17	8	14
Gouda	17	17	35	22	4	6
Gouda	17	15	45	12	5	7
Port du Salut	16	16	37	13	7	11
Mimolette	14	21	29	16	7	12
Parma	9	25	12	33	12	8
Emmental	16	15	16	32	14	7
Emmental	17	23	10	31	9	11
Emmental	14	15	19	29	12	11
Gruyere	15	15	22	28	10	9
Taleggio	19	20	37	9	5	10
Münster	21	16	34	12	6	10
Pirinees	15	16	31	15	7	16
Tilsit	18	20	21	23	7	10
Provolone	10	21	18	32	8	11
Tilsit	17	24	14	22	9	13
Mozzarella	19	25	23	15	4	14
Appenzeller	12	15	26	23	11	14
Brie	18	14	36	15	6	12
Brie	20	23	29	13	1	15
Camembert	11	23	38	12	6	11
Beaumont	22	17	34	11	5	10
Danablau	15	19	20	13	12	21
Roquefort	14	18	9	12	15	31
Roquefort	10	11	28	18	7	26

Tabla 6 Composición de aminoácidos de las metaloproteasas de P. camembertii y P. roquefortii.¹⁰¹

Aminoácido	<u>P. camembertii</u>		<u>P. roquefortii</u>	
	Calculado (Residuos/mol)	Número más cercano	Calculado (Residuos/mol)	Número más cercano
Ácido aspártico	20.4	20	17.2	17
Treonina	23.6	24	22.3	22
Serina	18.1	18	18.4	18
Ácido glutámico	13.6	14	12.2	12
Prolina	4.7	5	4.4	4
Glicina	10.4	10	11.5	11
Alanina	30.9	31	30.4	30
Cisteína	6.4	6	6	6
Valina	7.4	7	9.7	10
Metionina	0	0	0	0
Isoleucina	3.4	3	2.6	3
Leucina	16.3	16	16.7	17
Tirosina	10.9	11	11.7	12
Fenilalanina	3.5	3	2.2	2
Triptofano	0	0	0	0
Lisina	10.1	10	9.9	10
Histidina	3.1	3	3.1	3
Arginina	2.1	2	3.1	3
Total		183		180

TABLA 7. Composición de ácidos grasos libres (AGL) de variedades de quesos suaves y semisuaves. ¹²³

	País de Origen	Concentración de AGL (ppm)								Total
		C 4:0	C 6:0	C 8:0	C 10:0	C 12:0	C 14:0	C 16:0	C 18:0 y afines	
Camembert	Alemania	35	5	14	35	43	69	270	210	681
Brie	Francia	124	9	19	44	74	255	839	1314	2678
Port Salut	Francia	41	4	8	54	33	86	275	199	700
Monterrey	E.U.	93	3	10	37	20	110	252	211	736
Roquefort	Francia	992	751	715	2104	1403	2632	6452	17404	32453
Azul	E.U.	1146	777	546	1275	1835	4147	11416	14088	35230
Limburger	E.U.	1457	688	24	50	92	602	565	709	4187
Edam	E.U.	60	8	9	14	47	39	122	57	356
Colby	E.U.	81	9	33	49	22	67	196	93	550
Gjetost	E.U.	106	35	31	180	49	170	456	631	1658
Leche de cabra	E.U.	126	69	158	625	206	310	970	2094	4558
Sapsago	Suiza	a	38	10	58	0	45	37	23	211
Gruyere	Suiza	1037	83	6	16	13	58	193	75	1481
Suizo	Holanda	170	90	45	122	208	311	1904	1427	4277
Brick	Alemania	72	2	8	35	22	63	161	39	402
Cheddar	E.U.	15	2	6	25	37	103	285	524	997

a: Pico oscurecido por un compuesto desconocido

Tabla 8. Producción de 2-heptanona a partir de diferentes concentraciones de ácido octanoico por P. roquefortii en diferentes etapas de germinación. ¹⁴⁸

Ácido Octanoico (μmol)	μmol de 2-heptanona producidos durante <u>la germinación de esporas</u>		
	Esporas en reposo	24 h	32 h
3	2.20	2.40	2.03
6	4.14	3.23	1.30
9	5.94	0.73	0.36
12	7.14	0.28	0.26
15	6.54	0	0

Tabla 9. Contenido de metil cetonas (2-alcanonas) en muestras de queso azul.^{58,96}

Metil cetona	<u>µg /10g de queso azul seco</u>			
	A ^a	B ^a	C ^a	D ^b
2-propanona	65	54	75	210
2-pentanona	360	140	410	1022
2-heptanona	800	380	380	1827
2-nonanona	560	440	1760	1816
2-undecanona	128	120	590	136
2-tridecanona	0	0	0	100
Total	1940	1146	4296	5111

^a A, B y C son muestras comerciales de queso azul madurado

^b queso azul madurado durante 2 meses

Tabla 10 Compuestos volátiles producidos por cultivos de P. camembertii desarrollados en un medio definido.⁴⁶

Compuesto	Calidad de olor del efluente de columna	Umbral de olor ¹ (ppb)	concentración relativa μg	
			Cultivo joven (5 días)	Cultivo maduro (29 días)
3-octanona	similar a tierra/champiñón/cetónico	50	0.02	0.09
3-octanol		18	0	0.25
1,5 octadien-3-ona	hojas de geranio	0.001	tr	tr
1-octen-3-ol	champiñones crudos	10	0.35	17.40
1,5-octadien-3-ol	tierra/geranio	10	tr	1.03
2-metoxi-3-isopropil-pirazina	tierra/nuez/similar a papa	0.002	0	0.01
2-metiliso-borneol	mohoso/tierra	0.1	0.05	0.16
2-metil-1-propanol			1.60	0.65
2-metil-2-pentenal			0.45	0.19
3-metil-1-butanol		4.75×10^3	14.08	0.78
Naftaleno			0.06	0.14
Damascenona		10	tr	tr
Ácido octanoico			0.03	0.08

¹ Concentraciones umbrales en agua.
tr: trazas

Tabla 11. Producción de ácido micofenólico por cultivo de P. roquefortii en diferentes medios. ¹⁹⁶

Cepa	Medio	Ácido micofenólico ^a (µg/g de medio)
603	I	81.0
	II	60.7
	II	74.8
	IV	9.2
549	I	48.6
	II	54.6
	II	63.5
	IV	1.62
280-67	I	26.7
	II	25.2
	II	21.7
	IV	0.64

^a Datos obtenidos después de 10 días de incubación a 15 ° C.

Medio I: Solución Czapek con dextrosa.

Medio II: Medio semisintético usado para la producción de micotoxinas.

Medio III: 2% extracto de levaduras y 5% sacarosa.

Medio IV: Leche cuajada.