



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "CUAUTITLAN"

**"DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA
LIPASA FUNGICA EXTRACELULAR OBTENIDA DEL**

Penicillium roqueforti."

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A :

MARISELA NATZIDIELI ARAGON CALDERAS

ASESORES: Q.F.B. SUSANA PATRICIA MIRANDA CASTRO.

I.B.Q. FRANCISCO MONTIEL SOSA.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1997



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUHUILAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ACUERDO DE LOS ACREDITADORES

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA U.E.S. CUAUHUILAN
P R E S I D E N T E

DR. Ing. Rafael Rodríguez Coballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la U.E.S. - U.

Con base en el artículo 20 del Reglamento General de Exámenes que para fines de referencia se anexa, y en el que se trata de la "Determinación de la actividad profesional de la Ingeniería Química extractilera obtenida del Bazo de la Cañadilla",

que presenta la Ing. Guadalupe Sánchez Martínez Aragón Calderón, con número de cédula profesional 1175533, y en la expedición de 11116 de la Ingeniería en México,

Considerando que de la misma se cumplieron los requisitos exigidos para ser inscrita en el RAZO PROFESIONAL correspondiente, de acuerdo a nuestro VOED 01/03/08/01,

A T E N T A M E N T E
"POR EL RAZO PROFESIONAL EXPEDIDO"
Cuauhuilan, Tlaxcala, México, de los días 20 de Octubre de 1958

PRESIDENTE: Jaime Keller Torres
VOCALES: Rafael Rodríguez Coballos
SECRETARIO: Rafael Rodríguez Coballos
PRIMER SUPLENTE: Rafael Rodríguez Coballos
SEGUNDO SUPLENTE: Rafael Rodríguez Coballos

Rafael Rodríguez Coballos
Rafael Rodríguez Coballos
Rafael Rodríguez Coballos

DEDICO ESTA TESIS A:

MIS PADRES:

GILBERTO ARAGON LUNA Y
MA. CELIA CALDERAS JIMENEZ.

MI HERMANA Y SOBRINA:

AMERICA E. ARAGON CALDERAS Y
ANA PAULINA MENDOZA ARAGON.

A LAS FAMILIAS:

ARAGON LUNA,
CALDERAS JIMENEZ Y
CHAGOYA ARZATE.

A MIS ASESORES DE TESIS:

QFB. S. PATRICIA MIRANDA CASTRO.
IBQ. FRANCISCO MONTIEL SOSA.

A MIS AMIGOS:

DALIA N. BRAVO COVARRUBIAS
LUCIA BALMORI CONSUEGRA Y
OSCAR VAZQUEZ GARDUÑO.

Y MUY ESPECIALMENTE A MI NOVIO:

ICARO O. CHAGOYA ARZATE.

A TODOS USTEDES MIL GRACIAS POR SU AMOR, SABIDURIA, CONFIANZA,
APOYO, COMPRENSION Y LEALTAD.

GRACIAS DIOS MIO POR HABERME
DADO LA OPORTUNIDAD DE VIVIR
Y DE HABER ALCANZADO UNA DE
MIS METAS.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
CUADRO METODOLÓGICO	5
1. GENERALIDADES.	6
1.1 HISTORIA DEL QUESO.	6
1.2 DEFINICIÓN DEL QUESO.	9
1.3 CLASIFICACIÓN DE QUESOS.	10
1.4 FABRICACIÓN DE QUESOS.	17
1.5 DEFECTOS EN EL QUESO PROCESADO.	22
1.6 DEFINICIÓN Y USOS DE QUESOS MODIFICADOS ENZIMÁTICAMENTE.	23
1.7 QUESOS AZULES: CARACTERÍSTICAS Y ELABORACIÓN.	26
1.8 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS QUESOS AZULES.	33
1.9 DEFECTOS DE LOS QUESOS AZULES.	34
1.10. CARACTERÍSTICAS DEL <i>Penicillium roqueforti</i>	35
1.11 LIPASAS.	38
1.12 CAMBIOS BIOQUÍMICOS Y ORGANOLÉPTICOS OCASIONADOS POR LIPASAS DURANTE LA MADURACIÓN DEL QUESO AZUL.	43
1.13 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.	49

2. METODOLOGÍA.	57
2.1 OBTENCIÓN DE LA CEPA DEL <i>Penicillium roqueforti</i> .	57
2.2 IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA DEL <i>Penicillium roqueforti</i>	57
2.3 FORMULACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA LA INDUCCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LIPASAS.	57
2.4 CULTIVO DE LA CEPA DE <i>Penicillium roqueforti</i> EN EL MEDIO SELECCIONADO PARA LA PRODUCCIÓN DE LIPASAS.	59
2.5 EXTRACCIÓN Y SEMIPURIFICACIÓN DE LA LIPASA DEL <i>Penicillium roqueforti</i> .	60
2.6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN LOS EXTRACTOS CRUDOS DE LA LIPASA DEL <i>Penicillium roqueforti</i> .	63
2.7 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS EXTRACTOS DE LA LIPASA DEL <i>Penicillium roqueforti</i> A DIFERENTES CONDICIONES DE pH, TEMPERATURA Y TIEMPO.	64
2.8 MEDICIÓN DE LA CANTIDAD DE PROTEÍNA EN LOS EXTRACTOS SEMIPUROS DE LA LIPASA.	64
2.9 DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE LA LIPASA (ELECTROFORESIS SDS-PAGE 12%).	65
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	66
3.1 OBTENCIÓN DE A CEPA DEL <i>Penicillium roqueforti</i> .	66
3.2 IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA DEL <i>Penicillium roqueforti</i> .	66
3.3 FORMULACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO INDUCTOR PARA LA PRODUCCIÓN DE LIPASAS.	66
3.4 CULTIVO DE LIPASAS DEL <i>Penicillium roqueforti</i> .	67
3.5 EXTRACCIÓN Y SEMIPURIFICACIÓN DE LAS LIPASAS DEL <i>Penicillium roqueforti</i> .	67

3.6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL EXTRACTO CRUDO DE LA LIPASA.	68
3.7 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS EXTRACTOS A DIFERENTES CONDICIONES DE pH, TEMPERATURA Y TIEMPO.	69
3.8 MEDICIÓN DE LA CANTIDAD DE PROTEÍNA EN LOS EXTRACTOS SEMIPUROS DE LA LIPASA.	74
3.9 PESO MOLECULAR DE LA LIPASA DEL <i>P. roqueforti</i>.	75
CONCLUSIONES.	80
ANEXO 1: ELABORACIÓN DEL QUESO AZUL.	82
ANEXO 2: NORMA DE CALIDAD PARA EL QUESO AZUL.	86
ANEXO 3: DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DE BRADFORD.	88
ANEXO 4: FUNDAMENTOS, REACTIVOS Y METODOLOGÍA PARA REALIZAR ELECTROFORESIS.	90
BIBLIOGRAFÍA	96

INDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICAS.

FIGURAS

1. PRODUCCIÓN DE METIL CETONAS Y ALCOHOLES SECUNDARIOS DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES PRODUCIDOS POR <i>Penicillium roqueforti</i>	24
2. ESQUEMA DEL <i>Penicillium roqueforti</i>	37
3. METABOLISMO DE LOS ÁCIDOS GRASOS POR EL <i>P. roqueforti</i> COMO OCURRE EN EL QUESO AZUL.	47
4. TIPOS DE REACCIONES CATALIZADAS POR LAS LIPASAS.	48
5. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL COMPORTAMIENTO CINÉTICO OBSERVADO EN ENZIMAS QUE OBEDECEN AL MODELO DE MICHAELIS-MENTEN	50
6. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN UNA REACCIÓN CATALIZADA POR ENZIMAS	51
7. EFECTO DEL pH EN UNA REACCIÓN CATALIZADA POR ENZIMAS.	52
8. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA ECUACIÓN DE LINEAWEAVER-BURK.	53
9. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA ECUACIÓN DE EADIE-HOFSTEE.	53
10. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA ECUACIÓN DE HANES.	53
11. INHIBICIÓN POR EXCESO DE SUSTRATO EN LAS REPRESENTACIONES DEL MODELO DE MICHAELIS-MENTEN Y LINEAWEAVER-BURK	54
12. DESVIACIÓN DE LA CINÉTICA DE MICHAELIS-MENTEN POR UN FENÓMENO DE "ACTIVACIÓN POR SUSTRATO".	55

13. PRINCIPALES MECANISMOS DE INHIBICIÓN Y MODIFICACIONES A LA REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LINEAWEVER-BURK.	56
14. DIAGRAMA REPRESENTATIVO DE LAS BANDAS DE PROTEÍNAS DE LA LIPASA DEL <i>P. roqueforti</i> EN UN GEL DE POLIACRILAMIDA AL 12%.	78
TABLAS	
1. DEFECTOS EN LOS QUESOS PROCESADOS.	23
2. PROMEDIO DE COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS PRINCIPALES QUESOS AZULES.	33
3. LIBERACIÓN SELECTIVA DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES DE LA CREMA.	41
4. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS CRUDOS pH 9 Y 35°C.	68
5. RESULTADOS DE LA LONGITUD DE ONDA SEGÚN LA CANTIDAD DE PROTEÍNA PRESENTE EN LOS EXTRACTOS SEMIPUROS DE LIPASA FÚNGICA DEL <i>P. roqueforti</i> .	74
6. RESULTADOS DE LOG DE PESO MOLECULAR DE ENZIMAS CONOCIDAS (PATRÓN DE REFERENCIA) CONTRA LA MOVILIDAD RELATIVA DE LAS PROTEÍNAS (Rf).	75
7. RESULTADOS DEL PESO MOLECULAR DE LOS EXTRACTOS SEMIPUROS DE LIPASA FÚNGICA DEL <i>P. roqueforti</i> SEGÚN LA MOVILIDAD RELATIVA (Rf) QUE SE ALCANZÓ EN UN GEL DE ELECTROFORESIS AL 12% (SDS-PAGE 12%).	77
8. RESULTADOS DE LONGITUD DE ONDA CONTRA CANTIDAD DE PROTEÍNA. (CURVA PATRÓN)	89
9. RELACION DE CANTIDAD DE REACTIVOS NECESARIOS PARA PREPARAR GELES DE POLIACRILAMIDA A DIFERENTES CONCENTRACIONES	93

GRÁFICAS

1. NaOH 0.02n CONSUMIDO vs. TIEMPO PARA LOS DIFERENTES EXTRACTOS CRUDOS DE LIPASAS (pH 9 Y 35°C).	69
2. NaOH 0.02N CONSUMIDO vs. TIEMPO PARA EL EXTRACTO DE 13 DÍAS SEMIPURO (PRECIPITADO CON ETANOL).	70
3. NaOH 0.02N CONSUMIDO vs. TIEMPO PARA EL EXTRACTO CRUDO DE 13 DÍAS.	71
4. NaOH 0.02N CONSUMIDO vs. TIEMPO PARA EL EXTRACTO DE 10 DÍAS SEMIPURO (PRECIPITADO CON ETANOL).	72
5. NaOH CONSUMIDO vs. TIEMPO PARA LOS DIFERENTES EXTRACTOS ENZIMÁTICOS (pH 6 Y 30°C).	73
6. CURVA PATRÓN DE LOG PM. vs. MOVILIDAD RELATIVA (Rf).	76
7. CURVA PATRÓN DE LAS DIFERENTES PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD.	89

INTRODUCCIÓN.

El queso es un alimento universal, que se produce en casi todas las regiones del mundo a partir de leche de diversas especies de mamíferos. Los quesos se encuentran entre los mejores alimentos del hombre, no sólo por su gran valor nutritivo, sino también por la gran variedad de cualidades organolépticas que poseen, El proceso de elaboración del queso es muy variado, dependiendo de su tipo y origen. Existen quesos frescos y madurados.

Durante la maduración de los quesos, se deben cuidar las condiciones de aireación, humedad y temperatura de las cámaras o cavas donde ésta se realiza. Cada queso tiene sus condiciones -humedad y temperatura- óptimas para la maduración. Durante este periodo, los quesos pierden peso por evaporación del agua y desarrollan aromas y sabores característicos de cada tipo. Es necesario procurar que la pérdida de humedad sea uniforme en todos los quesos almacenados,

Los quesos azules (Roquefort, Bleus d' Auvergne, Aveyron, de las Causses, del Quercy, de Laqueville, la Fourme d'Ambert, el Bleu del Haut-jura, Bleu de Bresse, Gonzozola, Stilton, etc) son quesos madurados a los que se les ha adicionado *Penicillium glaucum* o *Penicillium roqueforti*, para que desarrollen las características sensoriales deseadas, generalmente, los quesos azules requieren entre 90 a 120 días para su maduración, conservados a una temperatura entre 7 a 11°C y con una humedad relativa mayor al 90% ²⁹. Para acelerar el proceso de maduración, se pueden adicionar enzimas (lipasas) procedentes del *Penicillium roqueforti*, considerándose estos quesos como quesos modificados enzimáticamente. Las enzimas en el queso, catalizan o aceleran diferentes reacciones donde grasas, proteínas, azúcares y otros productos intermedios se ven involucrados,¹³

El término "queso modificado enzimáticamente" fue utilizado por primera vez en 1974, a petición de la FDA (Food and Drugs Administration) para la aprobación del producto como ingrediente opcional en quesos procesados y productos lácteos. Los quesos modificados enzimáticamente, se elaboran a partir de un queso al que se le adicionan enzimas lipolíticas y/o proteolíticas en algún punto del proceso de elaboración: a la leche, a la cuajada o al queso terminado mediante el proceso de fundido.¹⁹

Como se mencionó anteriormente, el uso de lipasas en la elaboración de quesos implica una reducción en los tiempos de maduración, mientras se generan los aromas y sabores deseados en unos cuantos días o inclusive en pocas horas.²⁴

De esta forma, el uso de enzimas en un queso, con las condiciones óptimas de su actividad enzimática previamente identificadas, se traduce en una disminución de costos, mano de obra, refrigeración y demás factores que intervienen en el proceso.²⁹

Además, las lipasas microbianas tienen la ventaja -en comparación con las lipasas pregástricas- de que su producción se realiza mediante fermentaciones, requiere de poco espacio y las condiciones de desarrollo, aislamiento y semipurificación, son fácilmente controlables.¹⁹

Con la presente investigación, se busca conocer los parámetros óptimos de la cinética enzimática (Temperatura, pH óptimos y tiempo de estabilidad), de la lipasa extracelular obtenida del *Penicillium roqueforti* para dejar establecidas las condiciones control a las que se someta ésta al ser empleada en la maduración de quesos azules.

OBJETIVOS Y ACTIVIDADES.

OBJETIVO GENERAL:

Obtención de la lipasa fúngica extracelular del *Penicillium roqueforti* para determinar su actividad enzimática.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1.-Aislamiento y purificación de la cepa del *Penicillium roqueforti* de un queso azul comercial para su posterior identificación y empleo en la producción de la lipasa.
- 2.-Formulación de un medio de crecimiento inductor para obtener la lipasa del *Penicillium roqueforti*.
- 3.-Determinación de la actividad enzimática en los extractos crudos de la lipasa del *Penicillium roqueforti* para detectar su presencia.
- 4.-Medición de la actividad enzimática en los extractos semipurificados de la lipasa del *Penicillium roqueforti* a diferentes condiciones de reacción (temperatura, pH y tiempo).
- 5.-Determinación del Peso Molecular (PM) de la lipasa del *Penicillium roqueforti* mediante electroforesis. (SDS-PAGE 12%)

HIPÓTESIS.

Si al examinar el comportamiento de la lipasa fúngica extracelular, se establecen los parámetros de control, entonces se pueden especificar las condiciones óptimas de su actividad enzimática.

ACTIVIDADES

1.1 Obtención de la cepa del *Penicillium roqueforti*.

1.2 Identificación de la cepa del *Penicillium roqueforti*.

2.1 Formulación de un medio de cultivo inductor de lipasas.

2.2 Cultivo del *Penicillium roqueforti* en el medio seleccionado bajo diferentes condiciones de crecimiento.

2.3 Extracción y semipurificación de lipasa del *Penicillium roqueforti*.

3.1 Neutralización de los ácidos grasos liberados por la lipasa del *Penicillium roqueforti*.

4.1 Determinación de la actividad enzimática en los extractos semipurificados a diferentes condiciones de pH (6,7,8 y 9).

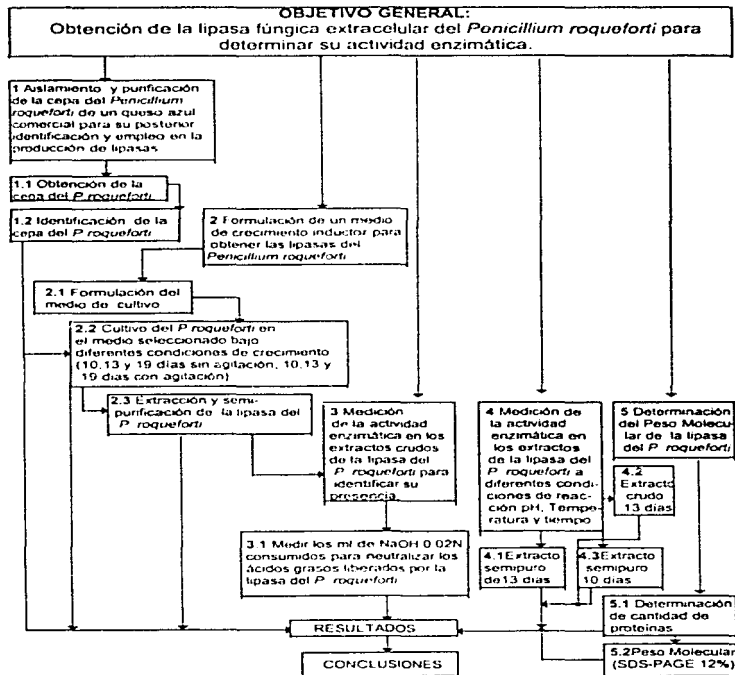
4.2 Determinación de la actividad enzimática en los extractos semipurificados a diferentes condiciones de temperatura (25,30 y 35 °C).

4.3 Determinación de la actividad enzimática en los extractos semipurificados a diferentes tiempos (0,5,10,15,20 y 30 minutos).

5.1 Determinación de proteínas de los extractos crudos y semipurificados de la lipasa del *Penicillium roqueforti*.

5.1 Electroforesis de los extractos crudos y semipuros de la lipasa del *Penicillium roqueforti*.

CUADRO METODOLÓGICO



1. GENERALIDADES

1.1 HISTORIA DEL QUESO

No se conoce exactamente donde y cuando apareció el queso sobre la corteza terrestre, factor lógico y natural, ya que probablemente el queso apareció después de producirse una serie de hechos fortuitos, como puede ser la acidificación natural de la leche después de varios días, el prensado de una leche ácida con eliminación del suero, etc. Además, dada la existencia de muchas y lejanas civilizaciones, no conectadas entre sí (Asia, Europa, África), el queso pudo aparecer en distintas épocas según continentes y países. Lo que sí está claro suponer es que el queso apareció cuando el hombre dejó de ser nómada y se hizo sedentario, criando animales y cultivando los campos. En esta época prehistórica surgió seguramente el ordeño de la leche de esos animales y la producción de queso. ,

Hay vestigios históricos (vasijas que contuvieron queso) de hace más de 6000 años antes de Cristo, en las civilizaciones mediterráneas (Egipto, Mesopotamia) que indican la existencia de variedades de queso. Homero cuenta en la Odisea como Polifemo, el gigante de un solo ojo que vivía en una isla, tenía rebaños de ovejas que ordeñaba y cuya leche empleaba en gran parte para producir quesos. En los jeroglíficos y relieves egipcios aparecen referencias a la cría de ganado, su ordeño y producción de quesos. ,

Los pastores de aquellas tribus sedentarias, encargados de ordeñar y cuidar el ganado son probablemente los primeros queseros del mundo. Tenían tiempo para observar a los animales. Observarían el fenómeno natural de la acidificación y es probable que entre los numerosos envases que utilizaban para guardar la leche, empleasen estómagos de rumiantes, donde está contenido el cuajo. De forma que verían que la leche contenida en estos estómagos se cortaba o cuajaba antes, y que al separarla del suero, daba una leche ácida de mejor sabor que la obtenida por otros procedimientos. ,

Este sería el impreciso momento del nacimiento del queso moderno. Después, con el transcurso de los siglos, hasta llegar al nuestro, se han ido perfeccionando las técnicas, pero el fundamento que aún perdura es el que se ha descrito.,

El queso alcanza un momento álgido durante los imperios griego y romano. En las comidas de reyes y emperadores nunca faltaba queso, traído a veces de remotas provincias. Por ejemplo, parece que el queso de cabra de Murcia (España) era muy apreciado por Julio César.,

En los mercados de Atenas y Esparta primero y Roma después se vendían quesos venidos de todos los puntos del imperio. Esto hace que se conozcan las técnicas queseras de otros países y que se produzca una mejora de las mismas. El cuajo es ya utilizado en todas partes y los quesos son desuerados cortando la masa coagulada y agitando. Se hacen prensados más o menos fuertes para tener quesos más secos que aguantasen desde lugares lejanos a los puntos de consumo. Los quesos son salados para realzar sus aromas y contribuir a su más larga conservación. El curado ya se hacía en cuevas a baja temperatura y alta humedad relativa, lo que favorecía el crecimiento de microorganismos que "afinaban" el queso dándole exquisitos e insospechados aromas y sabores.,

En Asia, a partir de animales salvajes también es posible que se elaborase queso desde tiempos muy remotos, pero hay un par de inconvenientes en estas civilizaciones que frenan el desarrollo de los quesos. Por un lado están las religiones budistas e hindú que consideran a las vacas como animales sagrados y por otro el cultivo del arroz como base de la alimentación de la mayoría de la población. Sólo ahora está adquiriendo la leche una relativa importancia en estas regiones donde por supuesto el arroz sigue representando el papel principal. Con la caída del Imperio romano, llega una época oscura para el queso. La Edad Media fue oscura en general para toda la civilización. Guerras, pestes e incultura se extendían por el antes floreciente imperio. Sin embargo, los monjes de muchos

monasterios, se erigieron como portadores de la antorcha de la cultura. Las técnicas queseras y de elaboración de vinos fueron recogidas por los monjes franceses, españoles, italianos, etc., escribiendo pequeños tratados sobre la elaboración de quesos, vinos y otros alimentos. A su vez, el intercambio de monjes dentro de la misma orden pero atravesando las fronteras de los países, llevaba consigo el intercambio de experiencias y estudios que beneficiaron la evolución de las técnicas queseras.

A finales de la Edad Media, los campesinos, no tan acosados por los impuestos para las guerras de sus señores feudales, empiezan a recuperarse y toman el relevo a los monjes. Las familias ganaderas hacen sus propios quesos. Los pastores que durante seis o más meses de buen tiempo se marchaban a la alta montaña donde habían buenos pastos para el ganado, se enfrentaban con un problema en esas alturas. No tenían accesos a las poblaciones de los valles para vender la leche, ya que en muchos casos se tardaba varios días en bajar. La única solución era hacer quesos allá arriba en las cabañas, y bajar una vez al mes a venderlos en los mercados de los valles.

Las técnicas queseras llegaron al nuevo continente con su descubrimiento por Cristóbal Colón. Los primeros colonos, muchos de ellos convertidos en pastores y granjeros, llevaron las técnicas europeas a esas tierras, produciéndose actualmente en Argentina, México, USA, Brasil, Colombia, Chile, etc., quesos propios de cada región de gran categoría resultado de la evolución de varios siglos de esas técnicas en suelo americano.

La producción actual de quesos en el mundo es de unos 13000 millones de kilos, siendo el primer país productor USA con el 20%, seguido de Francia con el 12% del total. Inglaterra produce el 8.6 y Rusia el 7%. España produce unos 220 millones de kilos ocupando el vigésimo lugar a nivel mundial, con un consumo de 7 kilos por habitante al año, alejado del consumo francés donde se llega a los 23 kilos. El aumento anual de la producción de queso se cifra en un 1% acumulativo y es interesante resaltar que mientras el consumo de mantequilla y leche está descendiendo en los países industrializados, aumenta el del queso.

1.2. DEFINICIÓN DE QUESO.

Queso es el producto fresco o madurado obtenido por coagulación y separación del suero de cualquiera de los siguientes productos: leche, nata, leche desnatada (total o parcialmente), suero de mantequilla o de una mezcla de cualquiera de ellos.,

Según el Diario Oficial de México, (18 Enero 1980, artículo 345) la definición de queso es:

Se entiende por queso al producto hecho de la cuajada obtenida de la leche entera, semidescremada o descremada, de vaca o de otra especie de animales, con adición de crema o sin ella, por la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos u otra enzima apropiada y con o sin tratamiento posterior de la propia cuajada por calentamiento, presión o por medio de fermentos de maduración, mohos especiales o sazonomiento. 9

La leche que se utilice en la elaboración de quesos, reunirá los siguientes requisitos: deberá utilizarse leche pasteurizada, con excepción del queso añejo, y los que autorice la Secretaría de Salud, en que se puede emplear leche no pasteurizada y se debe encontrar libre de alcalinizantes. 9

En la elaboración de quesos se podrá utilizar: 9

I. Cuajo comercial titulado y otras enzimas coagulantes autorizadas por la Secretaría de Salud.

II. Cultivos o fermentos lácticos.

III. Sal comestible.

IV. Cloruro de calcio.

V. Crema o mantequilla.,

VI. Microorganismos no nocivos para la salud, característicos de diferentes variedades de quesos de que se trata, y

VII. Colorantes y condimentos naturales y otras sustancias aprobadas por la Secretaría de Salud.

En la fabricación de quesos, queda prohibido el uso de los siguientes productos: 9

I. Sustancias grasas no propias de la leche utilizada.

II. Fécula.

III. Hierbas u otro producto para cuajar leche, diferentes a los señalados en el artículo anterior.

1.3. CLASIFICACIÓN DE QUESOS.

Para los efectos del reglamento del Diario Oficial de México, los quesos se clasifican en: 9

1.3.1. DE ACUERDO A SU PROCESO

- a) Frescos o frescales,*
- b) Maduros o afinados y*
- c) Fundidos.*

1.3.2. DE ACUERDO CON SU COMPOSICIÓN Y LA CLASE DE LECHE PASTEURIZADA.

- a) De leche entera,*
- b) De leche semidescremada,*
- c) De leche descremada,*
- d) De crema,*
- e) De doble crema y*
- f) Requesón.*

En la clasificación de quesos frescos o frescales, quedarán comprendidos todos los cremosos, semicremosos, descremados o cocidos, siempre y cuando se pongan a la venta al público en un plazo no mayor de 15 días después de la fecha de su elaboración, la cual deberá aparecer en la etiqueta. Se considerarán dentro de esta clasificación, los productos llamados asaderos, panelas, quesos para untar y otros semejantes, aun cuando hayan sufrido un proceso de transformación especial. 9

Dentro de la clasificación de quesos maduros o afinados, quedan comprendidos los de pasta dura, semidura o blanda, que hayan pasado por un tratamiento de afinación o maduración en bodegas especiales y por un plazo no menor de 15 días. 9

Se entienden por quesos fundidos los obtenidos por fusión de otros tipos de quesos, con o sin adición de alcalinos aceptados por la Secretaría y que una vez fundidos son moldeados apropiadamente. Los quesos que sirvan de materia prima y que estén destinados exclusivamente para la fabricación de quesos fundidos y para la venta al público, no requieren de registro ante la Secretaría, ni de pasteurización, pero reunirán los requisitos sanitarios correspondientes.

Los quesos elaborados a partir de leche entera, descremada y semidescremada, estarán dentro de los límites de grasa, proteína y humedad máximos que se indican a continuación:

a) QUESOS FRESCOS O FRESCALES

De leche entera	20%	GRASA Min	18%	PROT. Min	Y 56%	H ₂ O Max.
De leche semidesc	12%	-	-	24%	-	58%

b) QUESOS FRESCOS DE PASTA COCIDA E HILADA

De leche entera	23%	GRASA Min	24%	PROT. Min	Y 48%	H ₂ O Max.
De leche semidesc.	18%	-	-	28%	-	48%

c) QUESOS FRESCOS DE SUERO

De leche entera	5.0%	GRASA Min	10%	PROT. Min	Y 80%	H ₂ O Max.
De leche semidesc	0.5%	-	Max 10%	-	-	80%

d) QUESOS FRESCOS ACIDIFICADOS

De leche entera y crema	35%	GRASA Min	9%	PROT. Min	Y 55%	H ₂ O Max
De l. descr. y crema	4%	-	-	18%	-	75%
De l. descremada	2%	-	Max	15%	-	80%

e) QUESOS MADURADOS DE PASTA HILADA

De leche entera	25%	GRASA Min	22%	PROT. Min	Y 45%	H ₂ O Max
-----------------	-----	-----------	-----	-----------	-------	----------------------

f) QUESOS MADURADOS DE PASTA DURA

De leche semidesc.	22%	GRASA Min	28%	PROT. Min	Y 31%	H ₂ O Max.
--------------------	-----	-----------	-----	-----------	-------	-----------------------

g) QUESOS MADURADOS DE PASTA SEMIDURA

De leche entera	24%	GRASA Min	20%	PROT. Min	Y 50%	H ₂ O Max.
-----------------	-----	-----------	-----	-----------	-------	-----------------------

h) QUESOS FUNDIDOS PARA REBANAR

	24%	-	-	16%	-	48%
--	-----	---	---	-----	---	-----

i) QUESOS FUNDIDOS PARA UNTAR

	20%	-	-	12%	-	60%
--	-----	---	---	-----	---	-----

No habrá límites en el número y clases de hongos que se utilicen en la elaboración o afinación de quesos que lo requiera, como los tipo Roquefort, Camembert o similares, pero estos quesos no contendrán hongos o levaduras que indiquen contaminación, falta de limpieza en la elaboración y transporte y protección inadecuados del producto .

1.3.3 SEGÚN EL SISTEMA ESCOGIDO PARA LA COAGULACIÓN DE LA LECHE SE TENDRÁ LA SIGUIENTE CLASIFICACIÓN .

- a) Quesos al cuajo.
- b) Quesos ácidos.

En los primeros se consigue la coagulación por la adición de cuajo a la leche. En los segundos se consigue por acidificación. Hay, de todas maneras, quesos que combinan los dos sistemas (acidificación y adición del cuajo). Así tenemos el requesón, como ejemplo.

1.3.4. SEGÚN EL ORIGEN DE LA LECHE SE TIENEN LOS QUESOS:

- a) De vaca.
- b) De oveja.
- c) De cabra.

A veces los quesos se hacen como mezclas de dos o más clases de leche. Otros tipos de leche (búfalo, yak) son empleados en países no tradicionalmente lecheros.

1.3.5. SEGÚN LA TEXTURA DEL QUESO SE CLASIFICAN EN:

- a) Quesos compactos (sin ojos).
- b) Quesos con ojos redondeados.
- c) Quesos granulares, con ojos de formas irregulares.

Los quesos compactos están hechos con cultivos lácticos que apenas desprenden gases durante la fermentación y todos los azúcares son fermentados antes que el queso esté acabado. El Cheddar es un queso compacto. El queso de Burgos tampoco tiene ojos.

Los quesos con ojos redondeados tales como el Gruyère y el Emmental resultan de la producción de anhídrido carbónico (gas) por bacterias lácticas durante el proceso de maduración. El carbónico se acumula en los intersticios de la masa del queso.

Si la colocación de los granos de la cuajada en los moldes se hace en presencia del suero, se forman "burbujas" que luego se transformarán en ojos redondeados por el carbónico. Si la colocación de la cuajada en los moldes se hace sin suero, los intersticios quedan al aire y al desarrollarse la producción de carbónico, resulta en la formación de agujeros de formas y tamaños irregulares (quesos granulares). Tilsit es un queso granular, así como el Grazaema de Cádiz. etc.

1.3.6. SEGÚN EL TIPO DE MICROORGANISMOS UTILIZADOS EN LA MADURACIÓN TENDREMOS LA SIGUIENTE CLASIFICACIÓN:

- a) Quesos veteados como el Roquefort, Cabrales, etc., donde se produce el crecimiento de mohos *Penicillium* durante la maduración en cuevas ventiladas, dando esas vetas de color azul.
- b) Quesos de moho blanco, tales como el Camembert y el Brie, en los cuales durante la maduración hay un desarrollo de mohos blancos que les da su típico aspecto.
- c) Quesos con desarrollo bacteriano en la corteza tales como Saint Paulin, Port Salut, etc., en los que se unta la superficie de los quesos antes de su maduración con un cultivo de bacterias que se desarrollan dando características especiales a los quesos.

1.3.7. SEGÚN SU CONTENIDO GRASO, LOS QUESOS SE CLASIFICAN EN: 7 DE ACUERDO AL CÓDIGO ALIMENTARIO

- a) Doble graso: El que contenga un mínimo del 60%.
- b) Extragrasso: El que contenga un mínimo del 45%.
- c) Graso: El que contenga un mínimo del 30%
- d) Semigraso: El que contenga un mínimo del 20%.
- e) Magro: El que contenga menos del 20%.

1.3.8. SEGÚN EL CONTENIDO DE HUMEDAD, LOS QUESOS SE CLASIFICAN EN:

- a) Quesos frescos.
- b) Quesos blandos.
- c) Quesos semiblandos.
- d) Quesos duros.

Los quesos frescos, son aquellos que tienen un alto contenido en humedad (del 60 al 80% según variedades), con consistencia en general pastosa, que no han sufrido proceso de maduración, por lo que suelen tener sabor a leche fresca o leche acidificada. Normalmente, su color es blanco, aunque los hay de muy diversos colores al ser aromatizados con distintos sabores (fresa, piña, etc.) y se venden en tiendas como yogures. Deben consumirse rápidamente y su transporte y su conservación se harán refrigerados a 8-10°C.

Se les suele conocer también como quesos ácidos ya que la coagulación de la leche se lleva a acabo por acidificación de la misma, aún empleándose cuajo en muchos casos.

Son quesos sin corteza con una corteza muy fina, que apenas se presan, con lo que no se elimina mucho suero.

Entre otros tenemos los siguientes quesos frescos: Gervais, Cottage, Villalón, Burgos, panela, etc. ;

Los quesos blandos, son quesos que han sido madurados durante algún tiempo (desde semanas hasta varios meses), desarrollando aromas y sabores característicos de cada tipo. Suelen tener un contenido alto de humedad (40-50%) aunque no tan alto como los frescos. Ello es así porque durante la maduración se evapora parte del agua. Desarrollan corteza de cierta consistencia y la pasta es blanda e incluso semilíquida. La textura es cerrada aunque en algunas ocasiones se toleran ojos pequeños y poco numerosos.

Los quesos blandos más conocidos a nivel mundial son el Camembert y el Brie, ambos de origen francés. La fabricación de estos quesos se ha extendido por todo el mundo, especialmente el Camembert que se elabora industrialmente en muchos países (España, Portugal, USA, Argentina, México, etc.).

Por su importante contenido en humedad se deben consumir pronto ya que al endurecerse pierden sus más agradables características. Un Camembert duro, pasado, no dice absolutamente nada, mientras que si está en su punto es una delicia.

Quesos semiduros, aquí se incluyen una serie de quesos muy diferentes entre sí, como son los de pasta azul (Roquefort, Danablu, Cabrales, etc) y otros como el Tilsit y Saint Paulin de pasta amarilla, cremosa y flexible.

Los quesos semiduros son sometidos a maduración (desde unas semanas hasta varios meses), con lo que parte de la humedad desaparece durante la misma. Tienen un 30-40% de agua, pasta dura, compacta, con o sin agujeros, corteza más o menos dura, con o sin cortezas plásticas. EL Manchego y otros quesos se comercializan también como semiduros.

Quesos duros y compactos (con humedad de 15 a 25%). Entre este tipo de quesos tenemos el Cheddar como máximo representante, el Gruyère y Emmental también están clasificados como duros y tienen agujeros redondeados más o menos grandes. Hay otros de textura granular (ojos no redondeados) como Svecia.

A este grupo pertenecen también el Edam o queso de bola, de origen holandés y tan popular en todo el mundo. Algunos de estos quesos (Edam, Gruyère) se comercializan a veces sin hacer más que una corta maduración, pudiéndolos considerar como semiduros.

El queso Manchego curado está incluido en esta categoría, así como el Cantal francés, Cheshire, Roncal, etc.

Quesos fundidos, son el producto obtenido por la molturación, mezcla, fusión y emulsión con tratamiento térmico de una o más variedades de queso, con o sin la adición de agentes emulsionantes, de leche y productos alimenticios de otro tipo.

Los quesos escogidos se muelen y calientan a 70-75°C en una cuba con agitador obteniéndose una masa fundida que alimenta una máquina empaquetadora de quesitos en porciones. Al enfriar el quesito en su envase, solidifica.

Si se desea, cuando la mezcla de quesos molidos está calentándose en la cuba, se pueden añadir otros ingredientes (leche, emulsionantes, colorantes, etc).

El queso fundido es muy utilizado en la alimentación infantil ya que suele tener un sabor suave. Además es muy digestivo y rico en proteínas y grasas. Suele tener un extracto seco total de al menos un 50%. De este extracto seco total la mitad o menos es grasa .

Por lo tanto, los **quesos azules** son: quesos de leche entera de vaca u oveja, madurados, compactos, veteados, grasos o extragrasos y semiduros.

1.4. FABRICACIÓN DE LOS QUESOS.

En forma general, las etapas necesarias para la fabricación del queso son las que a continuación se mencionan, aunque existen variantes específicas para cada tipo de queso:

1.4.1 RECEPCIÓN Y TRATAMIENTOS PREVIOS DE LA LECHE (REFRIGERACIÓN, HIGIENIZACIÓN Y PASTEURIZACIÓN).

La leche que se recibe en la quesería debe ser de buena calidad, con contenido bacteriano bajo. Si es posible se debe recibir enfriada a 4-6°C en sistemas de acero inoxidable, que se descargará en tanques de acero inoxidable y se enfriará a 3-4 °C en caso de llegar a temperaturas mayores.

Aunque la leche recibida sea de buena calidad, siempre se pueden producir infecciones por lo que la quesería debe estar limpia y la leche se debe higienizar pasándola por una centrifuga para eliminar impurezas sólidas y pasteurizarla después a una temperatura de 70-80°C durante unos segundos (15-40) para eliminar microbios patógenos que pueden perjudicar la salud del consumidor. En ocasiones, al pasteurizar la leche, se obtienen quesos con menos aroma, pero se debe recurrir a esto en lugar de correr riesgos. En cualquier caso, los quesos elaborados con leche cruda y sometidos a un periodo de maduración superior a dos meses, pueden consumirse sin temor ,

En esta fase de tratamientos previos, se puede añadir a la leche:

- * *Cultivo de bacterias lácticas*, cuya misión es transformar el azúcar de la leche (lactosa) en ácido láctico, lo que hace que la leche se acidifique con lo que coagulará más fácilmente en la segunda etapa. La adición de cultivos lácticos se suele realizar a una temperatura de 25-30°C y se les deja crecer durante unos minutos.

- * *Cloruro de calcio*, que añadido a la leche contribuye a su acidificación y aumenta el contenido en calcio de la misma, lo que acelerará el proceso de coagulación. Se suelen añadir cantidades de 5 a 20 gramos por cada 100 litros de leche.

* *Nitrato de potasio*, que inhibe el crecimiento en la leche de bacterias que producen gases perjudiciales para el sabor y aroma del futuro queso. Se añaden dosis máximas de 20 gramos por cada 100 kilos de leche.

* *Colorantes naturales autorizados*.

* *Mohos* que ayudan a desarrollar aromas y sabores durante la maduración. Como el color de la leche depende de su contenido en grasa, varía con la estación del año, alimentación de la vaca, edad de la vaca, etc., para mantener un color uniforme del queso durante todo el año, algunas queserías añaden colorantes naturales.

1.4.2. COAGULACIÓN Y SEPARACIÓN PARCIAL DEL SUERO.

En esta etapa, se da la transformación de la leche en queso, y se realiza en una cuba. Por la adición del cuajo, quimosina o renina (extracto obtenido del cuarto estómago de los rumiantes jóvenes), la caseína (principal proteína de la leche) se coagula, englobando gran parte de la grasa y otros componentes de la leche. La reacción global consiste en una alteración no bien definida de la caseína y su transformación en paracaseína, lo que produce paracaseinatos de calcio insolubles (cuajada) en presencia de Ca^{++} . El cuajo es una proteasa, y su máxima actividad proteolítica se observa a pH 3.8. En la manufactura de quesos la leche se cuaja a pH 5-5.5. La actividad proteolítica del cuajo es prácticamente despreciable bajo tales condiciones. Por tanto, cuando el cuajo provoca el cuajado de la leche, su acción proteolítica es necesariamente limitada y probablemente específica. Más aún, las caseínas α y β no sufren cambios durante el proceso. Sólo la κ -caseína se ve afectada. Una porción de la molécula de κ -caseína se divide en grandes péptidos (macropéptidos), algunos de los cuales contienen carbohidratos. La κ -caseína residual, reducido su tamaño y libre de carbohidratos, recibe el nombre de κ -paracaseína. Así pues, el cuajo no cuaja directamente a la leche, sino que destruye la capa protectora de micelas catalizando la hidrólisis parcial de la κ -caseína, en alguna unión particularmente lábil. Desprovistos de su coloide protector, los complejos caseínicos del calcio se

precipitan y se produce la coagulación. Normalmente, la coagulación se realiza a 30-35°C aunque la temperatura óptima son los 40°C. El uso de temperaturas inferiores (30-35°C) es con objeto de permitir la utilización de una mayor proporción de cuajo (20 a 30 mililitros por cada 100 de leche) que es beneficioso para la maduración, además de producir un coágulo de leche no demasiado duro. ,

El extracto de cuajo es hoy en día sustituido en muchos casos por enzimas de origen vegetal u obtenidas a partir de diversos microorganismos (quimosina de *E. coli*).

Una vez acabada la coagulación, se procede a cortar la cuajada con utensilios provistos de cuchillas dentro de la propia cuba quesera, con lo que el suero atrapado puede escapar. El corte reduce las partículas de coágulo a las dimensiones que se quiera (desde décimas de milímetro, hasta 10-12 mm) Si se pretende que el queso resultante tenga poca humedad, se cortan partículas de coágulo pequeñas, porque así se separa mejor el suero. Si queremos quesos con más humedad se dejan partículas grandes en cuyo interior quedará retenida una cantidad importante de suero, muy rico en agua (93-95% de su composición). Los granos de cuajada son mantenidos en suspensión en la cuba por agitación, utilizándose para ello los mismos elementos que sirven para el corte. Con la agitación, los granos se hacen más compactos así que a los 10-15 minutos de agitación y corte, se puede drenar suero sin temor a que se desintegren dichos granos y escapen juntos con el suero. Este drenaje se puede realizar sin necesidad de parar los dispositivos de agitación. Al suero que escapa, se le hace pasar por un tamiz que retiene los granos de cuajada que pudiese arrastrar. De cualquier manera, durante el drenaje del suero, se suelen parar los dispositivos antes mencionados. ,

El calentamiento de la masa coagulada ya cortada, acelera el desuerado. Dicho calentamiento que se suele hacer entre 30 y 48°C, va acompañado de agitación para evitar que los trozos de coágulo se fundan unos con otros y se forme una pasta. Subiendo más o menos la temperatura en esta etapa tendremos quesos más o menos secos. Si es alta la temperatura, escapará mucho suero y tendremos quesos más secos, y viceversa, si es baja la temperatura o no

calentamos en absoluto, tendremos quesos más húmedos. Además subiendo la temperatura (44°C) se puede llegar a matar las bacterias lácticas que se añadieron anteriormente, deteniendo el proceso de acidificación. Ya a temperaturas de 35-36°C se empieza a inhibir su desarrollo. Este calentamiento se puede realizar de dos formas:

- * Adición de agua caliente a la masa. (En el caso de los quesos con alto contenido en humedad).

- * Calentamiento de la cuba exteriormente (Con un enchaquetado por donde circula vapor o agua caliente).

1.4.3. LLENADO DE MOLDES Y PENSADO PREVIO.

En el llenado de los moldes, continúa el desuerado. Según el tipo de queso que se quiera hacer, el prensado previo será más o menos intenso. Así, en el caso de quesos blandos, no se aplica presión alguna, dejando que el peso del propio queso en el molde actúe de prensa.

1.4.4. PENSADO.

Si el prensado se realiza de forma que quede aire atrapado entre los granos, tendremos quesos granulares. Si el prensado se realiza con los granos bañados en suero de manera que no quede sitio para el aire, los granos se fundirán entre sí y cuando durante la maduración se formen gases, éstos quedarán atrapados en la masa formando burbujas u "ojos" redondeados u ovalados.

1.4.5. SALADO.

Después del prensado, se procede a salar los quesos bien por inmersión directa en baños de salmuera o por salado directo con sal sólida aplicada a la corteza o mezclada con la masa. Se puede hacer el salado cuando los granos están aún en la cuba (sin haber pasado a los moldes), pero ello tiene el inconveniente de salar también el suero con lo que limitamos sus posibles aprovechamientos. La adición de sal ayuda a conservar el queso más tiempo, además de realzar sus aromas.

1.4.6. MADURACIÓN.

La maduración puede durar apenas unas horas para algunos quesos frescos, hasta meses y años para quesos duros. Por ejemplo el Gruyère se madura hasta 12 meses o más, siendo durante este periodo cuando por la acción de microorganismos vivos (*Bacillus linens*) desarrolla muchos de sus aromas y sabores típicos. El Manchego es sometido a maduración por un tiempo superior a los dos meses. Durante la maduración, deben cuidarse las condiciones de aireación, humedad y temperatura de las cámaras o cavas donde reposan los quesos. Cada queso tiene sus condiciones de humedad y temperatura para una óptima maduración. Durante este periodo los quesos pierden peso por evaporación y desarrollan aromas y sabores característicos de cada tipo. Es necesario procurar que la pérdida de humedad sea uniforme en todos los quesos almacenados.

1.5 DEFECTOS EN EL QUESO PROCESADO.

Se presentan muchos defectos en el queso procesado, pero un número crítico de sabores pueden examinarse. Los defectos en textura, color hoyos por gas, etc. son producidos durante la fabricación, pero no se deben presentar olores y sabores a podrido, fallo de higiene ó a químicos. El queso que presente estas últimas características de sabor debe descartarse.

Un queso elaborado con buena calidad, presenta un brillo natural y agradable. La textura es suave, sin arenosidades, y las piezas se cortan homogénea y uniformemente.

Los quesos procesados pueden tener defectos relacionados directamente con una fabricación inapropiada, incluyendo una pobre agitación, inadecuado o exceso de calor y una elección equivocada en cantidad y tipo de sales emulsificadoras.

Los problemas técnicos más comunes en los quesos, son la textura arenosa, cuerpo pegajoso, sabores jabonosos o agrios, formación de burbujas, descoloraciones del rosa al café y la formación de cristales.

La textura arenosa, se presenta con mayor frecuencia en los quesos frescos cuando se agitan, teniendo un pH por abajo de 5.5 y un exceso de emulsificante. El sabor jabonoso, se presenta en los quesos rancios que usan un exceso de fosfato trisódico y el sabor altamente ácido se asocia con algunas sales de fosfato.¹⁵

TABLA 1. PRINCIPALES DEFECTOS EN QUESOS PROCESADOS.¹⁵

DEFECTO	DESCRIPCIÓN	CAUSA.
SABOR	ACIDO	ASTRINGENTE EN LA BOCA Y LENGUA
	COMO RANCIO	EXCESO DE FOSFATOS
CUERPO Y TEXTURA	CORTO	ARENOSO O HARIOSO
	PESADO	GOMOSO
	MUY SUAVE	OLEOSO ESPONJOSO
	MUY FIRME	NO SE CONTAN LAS PIEZAS CON SUAVIDAD
	EXUDADO	GRASA Y AGUA SEPARADOS
	ADHERENTE	EL QUESO SE MANTIENE UNIDO AL CUCHILLO CON EL QUE SE MUESTRÁ
	ARENOSO	SENSACIÓN DE ARENA EN LA BOCA
APARIENCIA	CAFÉ O ROSADO	DESCOLORACIÓN
		SALMON
	GASEOSO	HOYOS REDONDOS DE TAMAÑO MEDIO O LARGO ALGUNAS VECES ACOMPAÑADOS DE GRITAS
	CRISTALES	CRISTALES BLANCOS DURETOS
		CONTAMINACIÓN DEL AMBIENTE
		EXCESO DE POLIFOSFATOS pH ANORMAL
		EXCESO EN EL TIEMPO DE COCCIÓN
		EXCESO DE GRASA CITRATOS O pH
		EXCESO DE POLIFOSFATOS
		INSUFICIENTE O IMPROPIOS EMULSIFICANTES, BAJO pH
		EXCESO DE HUMEDAD Y pH ELEVADO
		CRISTALES DE DIFOSFATO DE CALCIO TIROSINA LIBRE LACTOSA EMULSIFICANTE INSOLUBLES
		EXCESO EN EL COCCIO EN PRESENCIA DE LACTOSA DECOMPOSICIÓN DEL FINTE
		PRESENCIA DE CLIFORMES, CLOSTRIDIOS O BACTERIAS PROYONICAS ENVASADO INADECUADO Y CON FALTA DE HIGIENE
		EXCESO DE EMULSIFICADOR O FOSFATOS EMULSIFICADOR SIN DISOLVER CRISTALES DE TIROSINA LIBRE O EXCESO DE LACTOSA

15.- KOSIKOWSKI, F. "Cheese and Fermented Milk Food". Edwards Brother's USA. 1978.

1.6. DEFINICIÓN Y USOS DE LOS QUESOS MODIFICADOS ENZIMÁTICAMENTE.

El término "queso modificado enzimáticamente" (OME) fue utilizado por primera vez en 1974 a petición de la FDA (Food and Drugs Administration) para la aprobación del producto como ingrediente opcional en quesos procesados y productos lácteos.¹⁹

Los quesos que han sido tratados enzimáticamente para resaltar el sabor o una porción significativa en el sabor y olor, pueden llamarse quesos modificados enzimáticamente (OME). Las enzimas pueden ser adicionadas durante la manufactura del queso o después del queso cuajado o más aun, después de algún periodo de maduración. Los OME pueden tener una textura similar o

ligeramente modificada al compararlos con los quesos elaborados de forma tradicional.¹⁸

Las enzimas pueden ser adicionadas en diferentes etapas durante la manufactura del queso. La naturaleza del producto se ve afectado por la elección de las enzimas, condiciones de incubación y paso en el cual la enzima ha sido adicionada. La estandarización de sabores en quesos es una de las metas en la industria quesera, esto se puede controlar con el uso de enzimas en los productos a elaborar. La producción de los quesos que necesitan madurarse, puede verse beneficiada también con el uso de las enzimas; alternativamente dentro del mismo proceso se pueden incrementar el sabor u olor sin alterar las condiciones de elaboración del producto.¹⁸

Muchos de los compuestos producidos durante la maduración se encuentran en diferentes proporciones y cantidades, esto va a estar en función del tipo de queso que se maneje. En el QUESO AZUL, una serie de compuestos son importantes (ácido acético, ácido butanoico, acetona, metil cetonas, 2-pentanol, metil hexanato, etil butanato, 2-nonanol, y ácidos grasos libres) para la producción del sabor característico.¹⁸

El sabor característico en el queso azul se le atribuye a la producción de metil cetonas y a los correspondientes alcoholes secundarios. Estos compuestos son derivados de intermediarios de la β -oxidación de ácidos grasos, como se observa en la figura 1

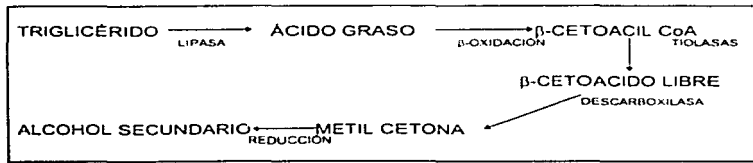


FIG. 1 Producción de metil cetonas y alcoholes secundarios de ácidos grasos libres producidos por *Penicillium roqueforti*. (CoA = Coenzima A)

Las lipasas son secretadas por el desarrollo de micelios e hidrolizan los triglicérido de la grasa de la leche. Los ácidos grasos resultantes se oxidan en β -cetoácidos por las enzimas β -oxidativas en la degradación de los ácidos grasos. Las metil cetonas son producidas por descarboxilación del ácido β -ceto. Los alcoholes secundarios son producidos por el ácido β -ceto por la reducción del grupo carbonilo. Las metil cetonas (C_5 a C_{11}) y los alcoholes secundarios son compuestos muy importantes para el desarrollo característico del queso azul.¹⁸

Este tipo de quesos son usados generalmente para alimentos procesados, como sustitutos parciales o totales, en los quesos añejados, en quesos en polvo o como aderezo de ensaladas.¹⁸

Conforme se va aprendiendo más acerca del sabor de los quesos, nuevas y mejores formas de quesos modificados enzimáticamente se pueden desarrollar, ofreciendo a la industria alimentaria una amplia variedad de sabores o ingredientes.¹⁸

1.7. QUESOS AZULES. CARACTERÍSTICAS Y ELABORACIÓN.

Los QUESOS AZULES ó QUESOS DE VENA AZUL, son quesos cuya pasta está interiormente surcada de jaspeaduras verdosas o azuladas formadas por los filamentos micólicos del moho *Penicillium glaucum*. Estos quesos, todavía llamados "quesos azules", son muy numerosos, pero entre ellos el más famoso sin discusión el *Roquefort*, cuyo carácter particular es ser un queso de leche de oveja.²⁹ Entre los quesos azules fabricados con leche de vaca, menos conocidos pero de todas formas excelentes, figuran los *Bleus d'Auvergne*, del *Aveyron*, de las *Causses*, del *Quercy*, de *Laqueuille* (Puy-de Dôme), la *Fourme d'Ambert*, el *Bleu del Haut-Jura*, el *Bleu de Brosse*, el cèlebre queso italiano *Gorgonzola*, el queso inglés *Silton*, *Wonsloydale* y *Blue Vinny*.²⁹ *Magura* en Bulgaria, *Niva* en Checoslovaquia, *Aura* o *Adelost* en Finlandia, *Rokfor* en Yugoslavia, *Bucegui* en Rumania, *Marvany sjt* o *Merinolort* en Hungría, *Rokpol* en Polonia, *Adelost* en Suecia, *Edelpilzkase* en Alemania, *Grunshimmolkase* en Austria, *Danablu* y *Mycella* en Dinamarca, y *Blue Cheshire* y *Blue Caledonian* de Escocia.²²

La mayor parte de los quesos de vena azul, que pertenecen al grupo de los quesos semiduros, resultan muy atractivos al consumidor por el sabor picante que se desarrolla como consecuencia de la hidrólisis de los componentes de la leche por los enzimas fúngicos. Cuando se parte de leche de vaca o de oveja, este sabor picante se debe en parte a las cetonas que se liberan a partir de los ácidos grasos. Los sistemas de elaboración de quesos de vena azul varían según la variedad de queso de la que se trate pero todos ellos intentan conseguir una cuajada de textura abierta y color blanco cremoso (debido a los blanqueadores o aditivos colorantes) en la que la hidrólisis protéica suministre un sustrato adecuado para la proliferación de los mohos. Los quesos de veteadado azul de maduración más rápida, suelen ser quesos más salados. Una vez que la hidrólisis protéica ha alcanzado determinada intensidad, los quesos se perforan con unas agujas adecuadas para que a través de los orificios así practicados se pueda

producir un adecuado intercambio de aire y anhídrido carbónico. Es ésta una manipulación esencial para la correcta maduración de las variedades de queso de vena azul. El color del cultivo fúngico varía en estos quesos desde el verde (*Penicillium glaucum*) hasta el azul (*Penicillium roqueforti*).²²

1.7.1. QUESO ROQUEFORT.

Es uno de los quesos más antiguos, como lo prueban numerosísimos documentos.²³ Un queso de este tipo fue enviado a Roma entre los años 100 a 250 D.C., y el nombre de Roquefort apareció por primera vez en 1070.¹⁵

En 1550, los habitantes de Roquefort obtuvieron del parlamento de Toulouse una orden que les aseguraba el privilegio de la fabricación, prohibiéndola fuera de la ciudad de Roquefort bajo pena de multa.²⁴

Toda la historia de Roquefort está dominada por la preocupación de defender un producto cuya fama inspiraba con frecuencia el fraude. En la actualidad, este queso es el único cuya denominación lleva la garantía de la ley, de fecha 26 de julio de 1925. El texto legal prevé que "Solo tienen derecho a la denominación Roquefort los quesos que han sido:

- a) Preparados y fabricados exclusivamente con leche de oveja,
- b) Fabricados y afinados conforme a los usos locales, fieles y constantes, en lo que concierne tanto al lugar de afinado como al método empleado".²⁵

El Roquefort se presenta en forma de un cilindro de 20 cm de diámetro y 9 cm de altura, con un peso de unos 2 kg.

Durante mucho tiempo solo se transformaba en Roquefort la leche de la región de las Causses (mesetas calcáreas) del Larzac. A partir de 1875, ante el incremento de las necesidades, la zona de aprovisionamiento se amplió considerablemente. En la actualidad comprende no solamente una vasta región alrededor de Roquefort, sino también una parte de los Bajos Pirineos, alrededor de San Juan Pied-de-Port y de Oïloron, así como en Córcega, alrededor de Ajaccio y Bastia. Por supuesto, para disfrutar de la denominación Roquefort, los quesos fabricados en todas las regiones citadas tienen que ser transportados en fresco a Roquefort, para ser afinados en las cavas naturales de esta localidad.²⁶

Al principio, la fabricación del Roquefort se hacía exclusivamente en granja, pero desde hace poco más de 80 años, la industrialización ha ido imponiéndose y hoy se fabrican con procesos industriales. Existen unas 130 fábricas que anualmente transforman 500 000 HI de leche. La producción es estacional, pues sólo se ordeña a las ovejas durante el primer semestre del año. La leche de cabra se caracteriza por tasas de caseína y de materia grasa muy elevada, que confieren al Roquefort su untuosidad tan apreciada.²⁹

La fabricación del queso comprende dos fases diferentes.

- a) La preparación del queso en fresco efectuado en fábrica,
- b) El afinado de éste, efectuado en las cavas de Roquefort.

1.7.1.1 FABRICACIÓN DE LOS QUESOS ROQUEFORT EN FRESCO (VER ADEMÁS ANEXO 1)

Colocada en cubas, se calienta la leche, tras maduración a 30-31°C y después se le añade cuajo (10 a 14 ml al 1/10 000 por cada 100 lt). La toma dura de 20 a 30 minutos y la coagulación de 1 3 a 2 horas. Después se corta la cuajada en cubitos del grosor de una nuez y se instala en una carretilla de desuerado, una especie de cajón sobre ruedas recubierto en su interior por una tela encima de un falso fondo calado. El desuerado de la cuajada tiene lugar en esta carretilla, acelerado por una ligera agitación. A continuación se procede a su introducción en los moldes, que son unos cilindros metálicos con fondo. Antiguamente, en las granjas se utilizaban exclusivamente moldes de tierra barnizada. Precisamente cuando se llenan los moldes es cuando se incorpora a la cuajada el inoculo de *Penicillium glaucum* o *Penicillium roqueforti*, formado por polvo de pan enmohecido. También se puede sembrar la leche antes de la coagulación y utilizar entonces cultivos puros de *Penicillium* distribuidos por los laboratorios en forma de suspensión de esporas. Para regular el desuerado se da varias vueltas al queso. Al cabo de 4 o 5 días a la temperatura de 18-20 °C se envía el queso a la cava de maduración.²⁹

1.7.1.2 AFINADO DEL QUESO ROQUEFORT

Antiguamente, las cavas de Roquefort eran simples grutas naturales llamadas *Fleurines* dentro de las cuales se instalaban anaqueles para almacenar los quesos. La ciudad de Roquefort se levanta sobre las ruinas de unos roquedos desprendidos en época muy lejana de un farallón elevado que bordea la Causse de Cambalou, situada frente a la Gran Causse del Larzac. Al romperse al pie de los farallones, los enormes bloques de piedra constituyeron un nuevo suelo con fisuras y numerosas grietas por las cuales se infiltran las aguas de lluvia que enfrían y humedecen el aire que circula sin cesar a través de los desgarrones del terreno. A la salida de las *fleurines*, la corriente de aire tiene una temperatura de 4 a 7°C, y su grado higrométrico, muy elevado, es próximo a 90-100%. Estas condiciones de temperatura y de humedad son las convenientes para el afinado del queso y confieren al pueblo de Roquefort una situación natural completamente excepcional.

Al principio, los *fleurines* bastaban para madurar toda la producción quesera, pero enseguida la extensión de ésta necesitó la instalación de cavas con extensiones de varios pisos en comunicación con las *fleurines*. El aire que procede de éstas últimas asegura la climatización natural de los locales.

En la cava, los quesos se clasifican y pesan antes de su traslado al saladero, donde la temperatura se mantiene en torno a los 9-10°C. Aquí se les deja durante 6 días, tiempo que se aprovecha para salarlos a mano varias veces. Según la calidad de los quesos, la dosis de sal varía de 20 a 50 gramos por unidad. Hoy se salan los quesos normalmente en la factoría y no en la cava. Después del salado, los quesos pasan a la picadora, máquina encargada de perforarlos muy finamente para ventilar la pasta y estimular el desarrollo del moho interior.

El afinado prosigue en la cava durante un mes y medio o dos por término medio a la temperatura de 7 a 8°C. Durante el afinado se raspan varias veces los quesos para ir eliminando la capa blanquizca de mohos y de bacterias que obstruyen la entrada de los canales de ventilación.

Una vez terminada la maduración del queso se procede a envolverlos en papel de estaño o de aluminio. Si no se venden inmediatamente, se almacenan en frigoríficos a una temperatura entre 1 y 4°C con lo que su conservación puede prolongarse varios meses.

1.7.2. QUESO BLEU D'AUVERGNE.

Es un queso de leche de vaca cuya presentación y fabricación se parecen a las del Roquefort. El afinado se realiza en locales cuya temperatura y humedad se obtiene artificialmente.²⁹

Al principio solo lo fabricaban en granja, pero hoy se fabrican ya en instalaciones industriales. La leche suele ser de calidad bastante mediocre. Para evitar en el queso el desarrollo ulterior de los gérmenes responsables de la hinchazón (bacterias coliformes o levaduras) conviene proceder a una siembra de bacterias lácticas puras antes de someterlo a la acción del cuajo. La leche alcanza entonces una acidez óptima de alrededor de 22°D (°D= acidez titulable. 10ml de leche fresca dan normalmente una titulación de 1.4 a 2.0 ml de NaOH 0.1M equivalente a 14 ó 20 °D).¹⁷

La fabricación es muy parecida a la descrita para el Roquefort. Se cuaja en una hora u hora y cuarto a la temperatura de 30-32°C, después se corta la cuajada antes de verterla en el cajón-carretilla de desuerado. La introducción en moldes y la siembra del moho se realizan igual que en el Roquefort. Se deja reposar los quesos a 19-20°C durante 3 a 5 días en una mesa de desuerado, donde se les da vuelta y lava con bastante frecuencia, a fin de eliminar la capa grasienta amarillenta de *Geotrichum lactis* que se desarrolla. A continuación se efectúa el salado varias veces en los tres días siguientes. El saladero debe estar a 10°C.²⁹

Una vez "picados", se colocan los quesos en cava, cuya temperatura es de 9 a 10°C y la humedad de 90 a 95 %. Aquí se mantienen alrededor de un mes y medio o incluso tres meses. También se puede, en cuanto aparece el moho azul, envolver los quesos en papel de estaño o aluminio, ponerlos después en cajas y

dejar que termine lentamente su maduración en cámara fía a 2-3°C, con lo que se reducen bastante las pérdidas de corteza.²⁹

1.7.3. QUESO LE BLEU DU HAUT-JURA.

Este tipo de quesos se presenta en forma de cilindro y con un peso de 6 a 8 kg. y con 25-33 cm de diámetro y de 7 a 11 cm de altura. La corteza es seca, amarillenta o rojiza, ligeramente hamosa y a menudo agrietada. La pasta es blanca, con motas de mohos azules.²⁹

En 1935 se delimitó legalmente la zona geográfica de la fabricación del Bleu del Haut-Jura. Esta delimitación no concierne solamente al territorio, sino también a la altitud. La fabricación es ilegal por encima de los 800 m. Esta disposición está destinada a garantizar la calidad bacteriológica de la leche con que se trabaja.²⁹

La adición del cuajo se realiza sobre una mezcla de leche de la víspera, que se deja madurar por la noche para constituir un fermento láctico natural y leche fresca del día.

La coagulación tiene lugar a 26-28°C en dos horas, en una cuba de madera (seille) con aberturas en la periferia susceptibles de ser obstruidas. Cuando el coágulo está hecho, se rompe lentamente y luego se deja reposar la cuajada durante una hora. Por las aberturas de la cuba se extrae entonces el suero. Cuando el desuerado va ya muy adelantado, se pone la cuajada en moldes de madera perforados y cubiertos por una tela. El desuerado prosigue así o a la temperatura de 22-23°C, ese mismo día por la tarde, o al cabo de 5 ó 6 horas, se quitan los moldes y se coloca los quesos en cubetas individuales, desprovistas de agujeros, dentro de las cuales se saian superficialmente. El suero que exuda se acumula en las cubetas y forma una salmuera que baña los quesos. Al cabo de una semana los quesos se retiran de sus cubetas, se pulen y se agujerean antes de llevarlos a la cava (10-12°C). El moho azul se desarrolla espontáneamente dentro de los quesos durante el afinado, que dura al menos de 1 a 3 meses.²⁹

1.7.4 CARACTERÍSTICAS DE OTROS QUESOS AZULES.

El queso Stilton originario de Inglaterra es elaborado a partir de leche de vaca, generalmente no necesitan el microorganismo iniciador que se adiciona en la cuajada y el añejado se realiza a 10°C durante 3 o 4 meses¹⁵. Son por lo general mas secos y menos salados que muchas de las otras variedades. Sin embargo, el elevado costo de la mano de obra y de los intereses financieros están obligando a los fabricantes de queso a elaborar quesos azules de maduración más rápida, que por esta misma razón no poseen las características genuinas de bouquet de los elaborados por el procedimiento tradicional (de larga maduración)²²

El queso italiano Gorgonzola ha sido imitado por los daneses (Mycella) y posee una variedad en color blanco: el "pannerone". El nombre original del queso Gorgonzola era Stracchino debido a que la raíz Stracco significa literalmente "cansado", debido a que la leche empleada para la elaboración del queso provenia de vacas cansadas que habían caminado largas distancias a través de los Alpes Italianos¹⁶. La corteza del Gorgonzola es rojiza y salpicada de agujeros para favorecer la penetración del aire. Es de color blanco-crema y las estrias internas son de color azul más intenso que el de otras variedades de queso de este tipo. Su bouquet es a especias, algo picante, pero agradable. Originalmente este queso se elaboraba con la cuajada de dos días consecutivos, pero en la actualidad la mayor parte de la leche empleada para su fabricación se pasteuriza y se utiliza la cuajada del día²²

1.8. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS QUESOS AZULES.

La composición de los quesos afinados varía con el tiempo, puesto que se fabrican a partir de leche cruda no normalizada. En el queso Roquefort, el extracto seco total oscila alrededor del 60% y la materia grasa pasa a veces del 55%. El rendimiento es de aproximadamente 25 kg. de queso afinado por cada 100 lt de leche. Las fabricaciones de segunda clase suelen venderse a veces bajo la denominación de "*Bleus de Brevis*" (azules de oveja).²⁹

El queso Bleu d'Auvergne contiene 50% de materia seca y 40% de materia grasa. El queso Bleu du Haut-Jura contiene 45% de materia grasa y un 58% al menos de extracto seco.²⁹

TABLA 2 PROMEDIO DE COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS PRINCIPALES QUESOS AZULES

TIPO DE QUESO/COMPUESTO	QUESO AZUL ¹⁵	DANABLUE ¹⁶	DANABLUE ¹⁶	GORGONZOLA ¹⁶	ROQUEFORT ¹⁶
Kcalorías	365	354	394	365-380	365-380
Humedad (g)	41.5	NR	NR	41-43	39-40
Grasa (g)	30.4	29.5	36.0	30-33	30-31
Proteína (g)	21.3	20.1	16.5	19-20	21-22
Carbohidratos (g)	1.5	2.0	1.0	1.0-2.0	2.0
Sal (g)	4.0	3.73	3.5	1-2	5-6
Otros	2.8				
Vit. A (u.i)	NR	858	1025	NR	NR
Vit. D (u.i)	NR	12	15	NR	NR
Calcio (mg)	NR	620	710	NR	NR

NR= No reportado.

15 - KOSIKOWSKI, F (1978) "Cheese and Fermented Milk Food" Edwards Brother's USA

16 - MADRID, A. (1994) "Nuevo Manual de Tecnología quesera" AMV España

1.9. DEFECTOS DE LOS QUESOS AZULES.

Los defectos de los quesos de vena azul son corrientes en muchas de estas variedades. Si las cuajadas son de textura demasiado apretada, el moho crece en la masa del queso con dificultad, o de manera desigual. La presencia de grandes cantidades de microorganismos coliformes provoca la formación de gas, que revienta la corteza. La presencia de antibióticos en la leche detiene el crecimiento de las bacterias lácticas dando lugar a la formación de cuajadas blandas, de textura apretada. Por el contrario, su crecimiento excesivo provoca la formación de cuajadas muy ácidas y cortezas quebradizas y agrietadas que provocan la pérdida de parte del aroma. Los queseros no suelen hacer objeciones a la presencia de un número moderado de ojos producidos por fermentación coliforme, ya que se considera que colaboran en la preparación de la cuajada para el mejor crecimiento de los mohos. Sin embargo, un número excesivo suele provocar bouquets anormales y cambios de color en la masa.²²

1.10. CARACTERÍSTICAS DEL *PENICILLIUM* (GÉNERO-FORMA)

Los penicilios son los denominados mohos verdes y mohos azules, que frecuentemente se encuentran en los cítricos y otros frutos (y que generalmente atacan y destruyen a los frutos), en los quesos del frigorífico y en otros alimentos que han sido contaminados con sus esporas. Los conidios de *Penicillium*, como los de *Aspergillus*, están por todas partes, en el aire y en el suelo.

El *Penicillium* produce algunas veces perturbaciones en los silos, en donde hecha a perder grandes cantidades de material ensilado, haciendo que sea inapropiado como alimento. Muchas especies de *Penicillium* son capaces de producir ácidos orgánicos, como cítrico, fumárico, oxálico, glucónico y gálico.

Industrialmente, los penicilios son también importantes en la fabricación de quesos y antibióticos. El *Penicillium roqueforti* es responsable del sabor del queso de Roquefort, así como también el queso azul danés y el queso italiano Gorgonzola maduran gracias a la acción de ciertos *Penicillium*.

El ciclo vital de un *Penicillium* típico es muy parecido al de *Aspergillus*, pero la morfología de las estructuras difiere considerablemente. El micelio produce conidióforos, simples, largos, erectos, que se ramifican a unos dos tercios de distancia hacia el ápice, de una manera característica, simétrica o asimétricamente, en forma de escoba. El conidióforo, comúnmente denominado pincel, recibe el nombre científico penicilo (*L. penicillum*=pincelito). La ramificación múltiple del conidióforo termina en un grupo de filídes que sostienen largas cadenas de conidios.

Penicillium roqueforti (ver fig 2) (Antiguamente *Stellata*) Existen dos especies, relacionadas ambas con la maduración del queso azul o Roquefort.

Colonias en general muy extendidas, verde azulado, luego verde oscuro, aterciopeladas, lisas, con bordes irregulares que constan de líneas radiales de conidióforos, llamadas por lo común araneosas por su semejanza con la tela de araña; reverso a veces casi incoloro, pero más a menudo verde muy oscuro, casi negro; penicilios claramente asimétricos, en general con tres niveles de ramificación; conidióforos rugosos, de 4 a 6 μ de diámetro; mótulas a menudo

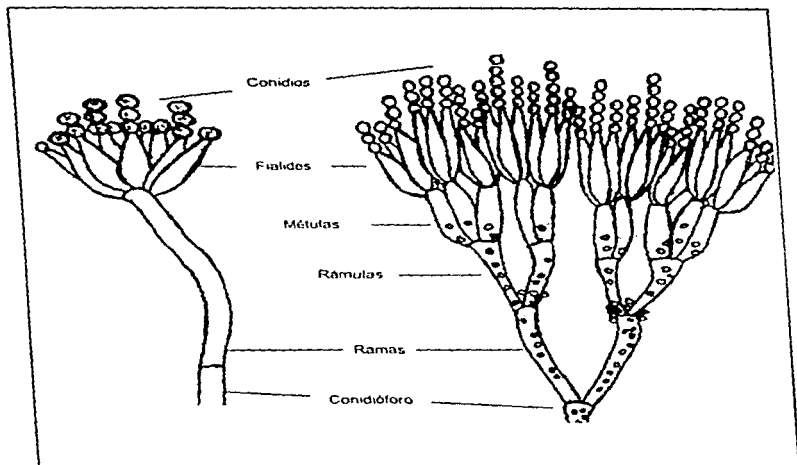
rugosas; filíides 8-12 x 3-3.5 μ ; conidios globosos o casi globosos; en su mayor parte de 4 a 5 μ de diámetro, pero a veces mayores, lisos, dispuestos en columnas sueltas o en cadenas enmarañadas. La mayoría de las cepas aisladas se desarrollan normalmente en casi cualquier medio de cultivo, pero algunas otras, especialmente las del Roquefort francés, crecen muy pobremente en agar-Czapek. Todas ellas se desarrollan bien en agar-malta y muchas producen conidióforos lisos.²³ El *Penicillium roqueforti* es la única especie de los *Penicillium* que puede crecer en un medio que contenga 0.5% de ácido acético y a altas concentraciones de etanol y a muy bajas concentraciones de oxígeno. Es fácil de reconocer y crece bien en agar de sucrosa-creatina (CREA).⁶

El *Penicillium roqueforti* es empleado en la maduración de los quesos del tipo Roquefort, Stilton, Gorgonzola y otras variedades. Se halla también con frecuencia en los hacinamientos de forrajes y abonos.²³

Penicillium casei. Difiere del anterior en que crece más despacio, careciendo de margen aracnoideo y con el reverso de las colonias amarillo a pardo, en lugar de verde. Se relaciona con ciertos quesos suizos.

Penicillium oxalicum. Colonias extensas, verde mate, cuyo margen vira del verde al pálido al blanco, aterciopeladas, con densas masas de esporas que tienden a formar costras cuando se agita el cultivo, reverso incoloro, amarillo pálido o rosado; penicilos irregularmente biverticilados, a menudo con rami y mótulas que arrancan del mismo punto; conidióforos lisos, 3.5 a 4.5 μ de diámetro, conidios elípticos, lisos, en su mayor parte de 5 a 5.5 x 3 a 3.5 μ , con cadenas reunidas en columnas. Se reconocen fácilmente por su esporulación abundante. Colonias verde oscuro y grandes conidios elípticos. Cuando se conservan en cultivos tienden a hacerse flocosas, con producción conidial muy reducida. Común en el suelo, se encuentra a veces como parásito de las plátulas del trigo.²³

Fig.2. Esquema del *Penicillium roqueforti*.²³



1.11. LIPASAS

Las enzimas controlan muchas de las reacciones naturales en la vida. En 1926 Sumner cristalizó la primera enzima: la ureasa; pero el concepto de enzima no se había definido.¹⁵

Como unidades orgánicas, las enzimas catalizan o aceleran las reacciones pero no son parte integral de la reacción misma. Las enzimas pueden ser proteínas que se dispersan o son solubles en agua, alcohol y acetona. Ninguna es dializable, esta es una propiedad en donde una sustancia puede pasar a través de un poro pequeño de una bolsa de celulosa o coloidal.¹⁵

Las enzimas naturales que se encuentran en productos lácteos son principalmente: proteasas, lipasas, fosfatasa alcalina y fosfatasa ácida, catalasa y peroxidasa. De estas, las lipasas y proteasas tienen gran influencia en la maduración de los quesos, pero su presencia es tenue. Esto es debido a que las enzimas naturales de la leche (excepto la peroxidasa) son sensibles al calor (temperatura mayor a los 70°C) y no son activas a pH de quesos en maduración temprana (pH 4.6-5.5). En los quesos Camembert, Brie o Azul, el pH aumenta con el tiempo para ser medio alcalino, por lo que bajo tales condiciones las lipasas o proteasas desarrollan un papel importante para que el queso obtenga las características deseadas.¹⁵

1.11.1 DEFINICIÓN

Las glicerol-éster-hidrolasas o Triacilglicerol-acilhidrolasa EC. 3.1.1.3 o Lipasas son enzimas que hidrolizan tri-, di- y monoglicéridos. Esta hidrólisis puede originar tanto di- y monoglicéridos como ácidos grasos libres. Algunas lipasas liberan, al hidrolizar la grasa de la leche, ácidos grasos de cadena corta, los cuales desarrollan sabores y aromas característicos.²⁴

Las lipasas son enzimas que tienen la capacidad de descomponer las grasas de la leche en sus ácidos grasos y glicerina. La pasteurización a 72-75°C durante 20 a 30 segundos las destruye en gran medida. Para su destrucción total se necesitan temperaturas superiores a los 100°C. Las lipasas de la leche se encuentran en las membranas de los glóbulos de grasa y también en el suero, o

bien unidas a micelas de caseína. Las lipasas contribuyen al desarrollo de aromas y sabores en el queso al descomponer las grasas. A veces, las lipasas de ciertas bacterias (*Pseudomonas*, *Micrococcos*, etc) pueden provocar la aparición de aromas y sabores desagradables en el queso, por lo que algunos queseros agregan sal a la leche, lo que inhibe el desarrollo de las lipasas. Esta práctica tiene el inconveniente de que los quesos retienen más humedad y el suero es salado y de más difícil aprovechamiento.¹⁵

En otros quesos se busca una lipólisis fuerte, por lo que la actividad lipásica es apreciada y fomentada. La liberación o descomposición de la grasa se produce por otros mecanismos además de por la acción de las lipasas:

- 1) Por la agitación (bombeo, circulación por tuberías, etc.) se libera parte de la grasa
- 2) Por el calor se libera grasa líquida.
- 3) Por la homogeneización mecánica a altas presiones se rompen las membranas protectoras de los glóbulos de grasa.

Todas estas acciones mecánicas y caloríficas facilitan la acción de las lipasas que se encuentran con grasa libre, a la que pueden atacar más fácilmente.¹⁶

Se han comprobado grandes variaciones en el desarrollo de la rancidez, según el origen de la leche. La procedente de vacas diferentes sometidas a idénticas condiciones de explotación tiene distinta facilidad para el enranciamiento.

Este fenómeno no parece que tenga relación con la raza ni con la estación del año; por el contrario, algunos regímenes alimenticios favorecen la lipólisis. Los leches del final de la lactación, "leches viejas", son más sensibles a la acción de las lipasas.¹

Los alimentos verdes tienen tendencia a impedir la acción lipásica. Existe un antagonismo entre el defecto enzimático de la rancidez y el defecto químico de la oxidación. Así, la acidez, el oxígeno disuelto, los metales Cu, Fe, etc. tienen una acción retardadora sobre la lipólisis, pero favorecen la oxidación.¹

La liberación de los ácidos grasos provoca una reducción de la tensión superficial (el grado de hidrólisis se determina por esta medida); por lo tanto, la aptitud para la producción de espuma aumenta. En los quesos madurados la lipólisis es un proceso normal a causa de las lipasas microbianas y fúngicas, que influyen en el aroma. La proporción de ácidos grasos libres, que normalmente es de 0.25% en la grasa de la leche, puede elevarse hasta el 6% en los quesos madurados con mohos superficiales (Camembert), por el contrario, aumenta poco en los quesos no enmohecidos (Gruyere). La hidrólisis libera preferentemente ácidos grasos insaturados.¹

En general, podemos decir que, dentro de una situación controlada, las enzimas contribuyen de forma importante al desarrollo de aromas y sabores típicos en los quesos, por lo que su destrucción por el calor puede suponer la pérdida de ellos. Este es uno de los principales problemas que plantea la pasteurización de la leche que se destina a la producción quesera.¹¹

1.11.2. FUENTES DE OBTENCIÓN.

Las lipasas se encuentran ampliamente en los animales, plantas y microorganismos. En particular, las lipasas obtenidas a partir de microorganismos se diversifican según sus propiedades enzimáticas y especificidad de sustratos. Consecuentemente, las lipasas microbiológicas tienen un gran uso a nivel industrial.²⁶

Las lipasas utilizadas para la elaboración de productos lácteos tradicionalmente han sido obtenidas de cabras y borregos en estado de lactancia. El procedimiento tradicional de elaboración de queso (Italia) utiliza, para la coagulación de la leche, una pasta elaborada a partir de los estómagos enteros, incluida la leche ingerida por el animal. Esta pasta proporciona al queso un sabor picante característico (queso romano, provolone y fontina), que no es obtenido cuando se elabora el queso utilizando los estómagos limpios para la preparación de la pasta. Después de varios estudios, Farnham (1946) concluyó que la enzima responsable de tales cambios es una esterasa secretada por glándulas ubicadas debajo de la lengua de las cabras, terneros y borregos lactantes.¹⁶

Otras fuentes de obtención de lipasas son de microorganismos como *Mucor miehei*, *Penicillium roqueforti*, *Penicillium caseicola*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*, etc. ¹⁶

A continuación se muestra una comparación entre lipasas de diferente procedencia. Esta comparación se basa en la liberación selectiva de ácidos grasos libres de la crema.

TABLA 3 LIBERACIÓN SELECTIVA DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES DE LA CREMA. ¹³

FUENTE LIPASA	BUTÍRICO (Mol%)	CAPROÍCO (Mol%)	CAPRÍLICO (Mol%)	CÁPRICO (Mol%)	LAURÍCO DE MAYOR P.M. (Mol%)
PASTA DE RENINA DE CABRA	32.8	11.3	7.1	11.8	33.6
ESTERASA PREGÁSTRICA DE CABRA	44.4	15.2	7.6	12.3	21.5
ESTERASA PREGÁSTRICA DE BORREGO	48.1	8.6	14.2	9.3	19.8
ESTERASA PREGÁSTRICA DE TERNERA	36.7	8.9	4.8	10.7	39.0
LIPASA DE LECHE PANCREÁTICA	13.5	8.2	10.2	8.7	60.0
LIPASA DE <i>A. niger</i>	8.4	2.1	TRAZA	TRAZA	89.1
LIPASA DE <i>A. niger</i>	43.1	18.0	20.2	17.5	TRAZA

13 -HUANG, H.T. (1976) "Enhancement of Cheese Flavors with Microbial Esterases" *Biotechnology and Bioengineering* USA. V 18 p 909-919

La lipasa del *Aspergillus niger* ha estado disponible por mucho tiempo. Esta lipasa libera ácidos grasos de la leche de C₄ a C₁₀. Su actividad es semejante a la de las esterases pregástricas. La lipasa de *A. niger* presenta actividad baja o casi nula sobre los triglicéridos con ácidos grasos de elevado peso molecular. En este caso, el perfil total de sabor en queso producido por la lipasa de *A. niger* posee las características que el inducido por la esterasa pregástrica. ¹³

La lipasa de *Aspergillus oryzae* ha sido satisfactoriamente utilizada para el desarrollo del sabor en quesos azules en conjunción con esporas de *Penicillium roqueforti*, sin embargo, el sabor del queso azul puede ser producido por fermentación sumergida de *P. roqueforti* sin la mediación de lipasa microbiana. ¹³

1.11.3. USOS DE LIPASAS EN ALIMENTOS.

En la industria láctea, las lipasas pregástricas son usadas en algunos quesos para desarrollar o aumentar el sabor, acelerar el proceso de maduración o ayudar a la producción de productos tipo queso. Los ácidos grasos de cadena corta obtenidos por las lipasas no solo funcionan como componentes del sabor, también como precursores de otros tipos de sabores. Aunque es evidente que las lipasas de origen animal liberan principalmente ácidos grasos de cadena corta, las lipasas de origen microbiano liberan principalmente ácidos grasos de cadena larga.²⁶

El mercado de estos productos es muy amplio debido a la gran aceptación de éstos por el público en general. Inicialmente se han utilizado lipasas de origen animal en la elaboración de quesos, pero desde los años setenta se intensificaron las investigaciones para emplear enzimas de origen microbiano.¹³ Las lipasas también son empleadas en reacciones de interesterificación, como aditivo en alimento de animales domésticos o como modificador de grasas en la producción de un sustituto de cocoa.³⁰

1.12. CAMBIOS BIOQUÍMICOS Y ORGANOLÉPTICOS OCASIONADOS POR LIPASAS DURANTE LA MADURACIÓN DEL QUESO AZUL.

La maduración o curado de los quesos significa colocar un queso "verde" a un almacenamiento donde se controlan la temperatura y la humedad relativa del área por cierto tiempo. Durante este almacenamiento, el queso adquiere características de textura, sabor y aroma característicos. Cada queso requiere condiciones diferentes de maduración. El queso Cheddar puede madurar bien a temperaturas de 5°C y a una humedad relativa del 85%, en cambio el queso Azul requiere 10°C y 95% de humedad relativa para el desarrollo inicial del moho y 4°C y 90% de humedad relativa para obtener las características particulares de este queso.¹⁵

Antes de que se inventara la refrigeración, en Inglaterra, Irlanda, Estados Unidos y otros países realizaban la maduración a temperatura ambiente, lo que ocasionaba una falta de control en el desarrollo del sabor y de textura, aunque la maduración se realizaba muy rápido, pero también se desarrollaban otros microorganismos no deseados que ocasionaban grandes pérdidas en la producción. Al cubrir los quesos con parafinas y mantenerlos en cuartos limpios de refrigeración se redujeron estos problemas y se mantuvo un control más estricto en su calidad, aunque esto significara una maduración por un tiempo más prolongado.¹⁵

Cuanto más alta es la temperatura durante el almacenamiento, mayores son las pérdidas de humedad en los quesos. La evaporación del agua tiene lugar por toda la superficie del queso. En su movimiento hacia el exterior el agua arrastra sustancias solubles (lactosa, sales, etc.), que tienden a acumularse en la corteza del queso, que, por lo tanto, será más rica en estos elementos que la masa interior.¹⁵

Durante la primera fase de maduración, cuando el queso está más húmedo, se le suele dar la vuelta para que se seque uniformemente y tenga una forma adecuada, ya que por su propio peso tiende a deformarse.¹⁶

Es importante hacer notar que cuanto más baja sea la temperatura se disminuyen las reacciones químicas y transformaciones provocadas por las bacterias y otros organismos presentes en la masa y superficie del queso. Para evitar que la pérdida de humedad sea excesiva en los quesos que se están madurando, las cámaras o espacios naturales deben tener humedad relativa alta (65 al 95%).¹⁶

En los 10 primeros días de almacenamiento, las pérdidas de peso de los quesos son mayores cuanto más baja es la humedad relativa. Así, tenemos que para una humedad relativa del 90% la pérdida de peso en esos 10 días puede ser del 1.5%, mientras que si la humedad es del 80% se acercará al 3%.¹⁶

También cuanto mayor es la aireación existente en una cámara de maduración, mayor es la pérdida de peso en los quesos. Una cierta aireación es conveniente en el proceso de maduración de muchos quesos, ya que ayuda a uniformizar las condiciones en toda la estancia. Para ello también es conveniente invertir la dirección del flujo de aire y cambiar los quesos de posición. Además, el aire debe ser bien distribuido por toda la cámara, evitando que tenga que cubrir distancias largas. Cuando la aireación es suave (0.1 m/s velocidad del aire), la pérdida de humedad no llega al 2% al cabo de 10 días, pero si la velocidad del aire llega a 0.5 m/s, la pérdida de peso en los quesos llega al 3%.¹⁶

La economía en ocasiones determina que tan rápido un queso se debe madurar, aunque esto no implique que las características del queso se deban perder.¹⁵

La maduración ocasiona muchos cambios en el cuerpo y sabor de los quesos. Un indicador de estos cambios es la variación de pH. Después de 24 horas de haber salado un queso Cheddar, el pH es entre 5.5 y 5.2, pero en seis meses aumenta a más de 5.5 a 5.6, debido a la producción de nuevos compuestos reguladores de pH. El pH del queso Azul o Roquefort cambia de forma similar, pero en mayor magnitud durante el ciclo de madurez. Un queso fresco Azul tiene un pH de 4.8, pero en 4 meses a 7°C aumenta a 7.2. Este cambio refleja los grandes cambios ocasionados por los compuestos que se han formado durante la maduración.¹⁵

Los microorganismos presentes en los quesos vienen determinados por muchos factores:

- * Tipo de fermentos añadidos a la leche.
- * Utilización o no de mohos en la superficie del queso.
- * Calidad microbiológica inicial de la leche.
- * Composición de la leche en proteínas, grasas, lactosa, etc.
- * Presencia de sustancias inhibitoras (antibióticos, pesticidas, detergentes, etc.)
- * Humedad, temperatura y aireación durante la maduración.
- * Contenido de sal en los quesos.
- * Acidez del medio (pH).
- * Calidad higiénica del proceso de elaboración, etc.¹⁶

La población bacteriana presente en los quesos es uno de los principales responsables de las transformaciones que se producen en los mismos durante la maduración en cámaras.¹⁶

Las bacterias y las enzimas bacterianas atacan a los componentes del queso (proteínas, grasa, lactosa) descomponiéndolos en parte y dando lugar a productos aromáticos típicos de cada variedad.¹⁶

Las enzimas microbianas desempeñan un papel importante en el desarrollo de sabor en los quesos. Además de las enzimas originalmente presentes en la leche y las utilizadas para la coagulación, trabajan en el desarrollo de las características de los quesos las enzimas producidas por los cultivos iniciadores de organismos residentes en el queso, en diferentes etapas durante el proceso de maduración.¹³

Las proteasas al degradar a la caseína modifican la textura y el sabor del queso maduro. Las lipasas al hidrolizar los triglicéridos de la leche proveen ácidos grasos y precursores de metil-cetonas. El complejo enzimático involucrado en la oxidación parcial de los ácidos grasos libres y las propiedades de β -cetoacil descarboxilasa generan los mayores componentes de sabor en el queso.¹⁴

Cada queso tiene su sabor. El sabor se origina a partir de las proteínas, grasas y lactosa que se descomponen, dando lugar a aminoácidos, péptidos, ácidos grasos, ácido láctico, cetonas, aldehídos, ésteres y alcoholes secundarios.¹⁵

La lactosa puede descomponerse en: ácido láctico por bacterias lácticas, en ácido butírico por bacterias butíricas, en CO_2 por coliformes, en alcohol etílico por fermentos alcohólicos, etc. Las proteínas son descompuestas tanto por los propios fermentos como por la renina, produciéndose péptidos y aminoácidos. Esta descomposición puede ser aún más fuerte llegando hasta el amoniaco, como pasa en los quesos de pasta azul, donde los aminoácidos sufren una descomposición posterior. Por ello, los quesos azules tienen un aroma fuerte.¹⁶ Muchos aminoácidos incluyendo la prolina son dulces, y pocos son amargos.¹⁵

Las grasas son descompuestas por la enzima lipasa en glicerina y ácidos grasos, así como en aldehídos y cetonas, compuestos todos que también contribuyen al conjunto de aromas del queso.¹⁶ Los ácidos grasos como el butírico son rancios, mientras que el caproico, caprílico y cáprico son picantes. Las cetonas, particularmente las que tienen de 7 a 9 carbonos desarrollan gran cantidad de aroma. En el queso azul se desarrollan metil cetonas en una concentración de 90 mg/kg, ácidos grasos libres de 48,000 mg/kg y 10mg/kg de alcoholes secundarios.¹⁵

Todo este conjunto de productos procedentes de la descomposición de los componentes del queso por la acción de microorganismos y sus enzimas son los que determinan el aroma y sabor de los quesos en conjunción con las proteínas, grasas, etc., que no se han descompuesto y que son la mayor parte.¹⁶

La fabricación de un queso azul de calidad depende críticamente del metabolismo de los lípidos presentes. El sabor dominante en los quesos azules como ya se mencionó es causado por metil-cetonas, las cuales son predominantemente derivadas vía la parcial oxidación de los ácidos grasos libres en el queso.¹⁴

Debido a la correlación cercana entre los niveles de ácidos grasos libres y la formación de metil-cetonas, el papel de las lipasas es muy importante, ya que estas proporcionan los ácidos grasos libres necesarios para la formación de sabor. Los ácidos grasos también proporcionan sabor y son precursores de las metil-cetonas. En ausencia de una lipólisis adecuada, el sabor del queso es pobre y de desarrollo muy lento. En la fig. 3 se esquematiza el metabolismo de

los ácidos grasos en los quesos azules.¹⁴ Durante la maduración, se presenta una acumulación gradual de metil-cetonas. El rango de liberación de ácidos grasos puede fijar la producción de metil-cetonas debido a que la adición de lipasas o el incremento de los niveles de lipasa del moho aumenta la liberación de ácidos grasos libres y la formación de metil-cetonas. Las metil-cetonas son derivadas de la oxidación parcial de los ácidos grasos liberados por la lipasa.¹⁴

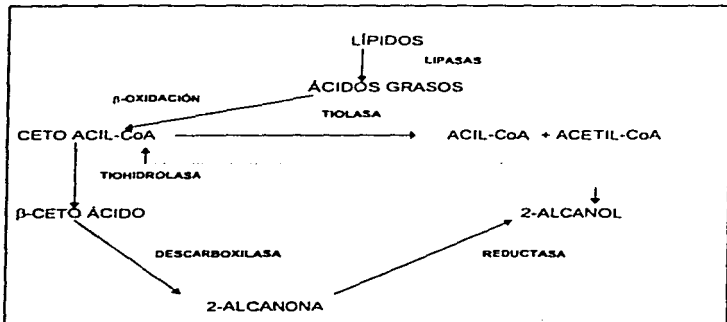


Fig. 3 Metabolismo de los ácidos grasos por el *Penicillium roqueforti* como ocurre en el queso azul. El grupo acil puede contener de 4 a 6 átomos de carbono.¹⁴

Las lipasas y esterases catalizan tres tipos de reacción (ver fig. 4). La acción catalítica de la lipasa es reversible.²⁸

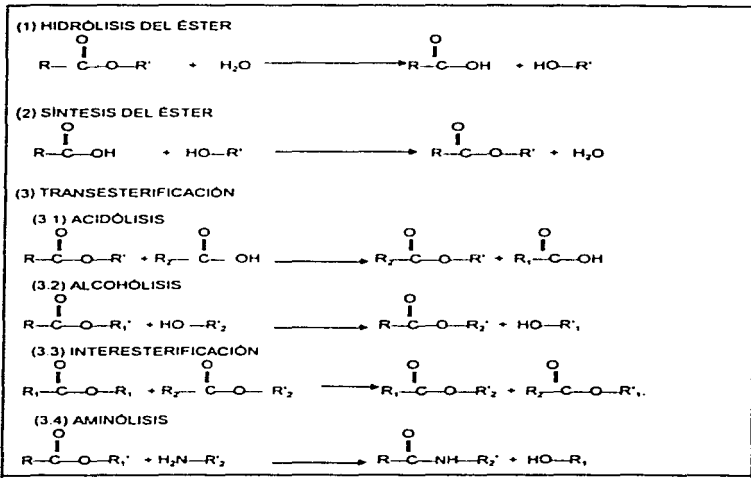
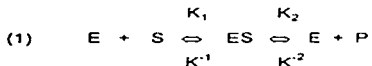


Fig. 4 Tipos de reacciones catalizadas por las lipasas.²⁸

1.13. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

Como ya se mencionó antes las enzimas pueden ser proteínas que se consideran como catalizadores biológicos que siguen por tanto las reglas generales de la catálisis.²⁰

El modelo de catálisis enzimática más simple y mejor conocido es el de Michaelis-Menten desarrollado en 1913. La teoría de Michaelis se ha desarrollado para las reacciones en que existe un solo sustrato (S) y supone la formación de un complejo enzima-sustrato (ES) que posteriormente da lugar al producto (P), regenerando la enzima (E), según se muestra en las siguientes reacciones.²⁰



Desarrollando las ecuaciones de velocidad que implican estas reacciones, suponiendo que se alcanza el régimen estacionario, $d(ES)/dt = 0$, que la reacción que da origen al producto es prácticamente irreversible y que la velocidad (v) de reacción, dada por :

$$(2) \quad v = dP/dt = k_2 (ES)$$

la velocidad es máxima (V_{max}) cuando la totalidad de la enzima en el medio se encuentra en forma de complejo:

$$(3) \quad v = V_{max} S / K_m + S \quad \text{donde:} \quad (4) \quad K_m = K^{-1} + K_2 / K_1$$

K_m es la constante de Michaelis (ver fig.5) y equivale a la concentración de sustrato para la cual la velocidad es la mitad de la máxima, también indica la afinidad que tiene la enzima por el sustrato en cuestión, pues cuanto menor sea su valor, menor será la concentración de sustrato para la cual la enzima alcanza su valor máximo de velocidad.²⁰

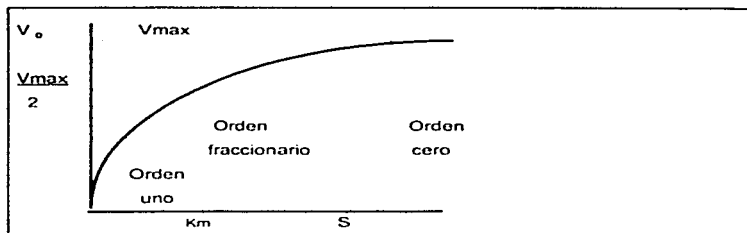


Fig. 5 Representación gráfica del comportamiento cinético observado en enzimas que obedecen al modelo de Michaelis-Menten.

Se ha estandarizado el potencial catalizador de las enzimas definiendo para cada enzima lo que se conoce como UNIDAD de actividad enzimática. una Unidad Internacional (U.I.) equivale a la cantidad de enzima capaz de catalizar la transformación de 1μ mol de sustrato por minuto en condiciones específicas de concentración de sustrato, temperatura, pH y fuerza iónica. Esta definición no siempre se puede aplicar porque en algunos casos es difícil medir analíticamente la desaparición de sustrato o la aparición de producto. Esta es la razón por la que en la literatura especializada se encuentran diferentes definiciones adaptadas a casos específicos. Las unidades estarán dadas en ml de solución o en mg de producto, según el estado físico. La actividad específica se da en mg de proteína y es un parámetro indispensable en la evaluación de la pureza o de un proceso de purificación de las enzimas.²⁰

Como toda reacción química, las reacciones enzimáticas se modifican con la temperatura, el fenómeno común de aumento en la velocidad de reacción cuando aumenta la temperatura, dada la mayor energía de las moléculas, se sobrepone a la desnaturalización de la enzima debido a su origen proteico. El resultado global de estas dos interacciones da como resultado un perfil con un máximo de velocidad a una temperatura que se ha denominado óptima (T° óptima), ver fig.6.¹⁹

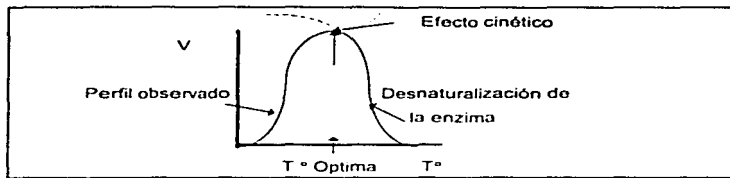


Fig. 6 Efecto de la temperatura (T) en una reacción catalizada por enzimas.

La parte correspondiente al efecto cinético se puede describir con la Ley de Arrhenius:

$$(5) \quad K = A e^{-E_a/RT}$$

Donde: K es la constante de velocidad de reacción, R la constante general de estado gaseoso, T la temperatura en °K y E_a la energía de activación característica de cada enzima.²⁰

En cuanto al pH, el comportamiento que siguen las enzimas es similar al descrito para la temperatura (fig 7); este efecto se puede deber a tres fenómenos independientes:

- * Desnaturalización irreversible de las enzimas a pH extremos, debido a la pérdida de su estructura especial por ruptura de enlaces no covalentes.
- * Ionización del sustrato si es que posee grupos polares.
- * Estado de ionización de la enzima.²⁰

Es necesario hacer notar que el pH al cual la enzima alcanza su máxima actividad no coincide necesariamente con el pH al que observa su máxima estabilidad.

Para realizar el estudio cinético de una enzima dada, se debe determinar la variación de la velocidad inicial de reacción a diferentes concentraciones de sustrato, en condiciones óptimas de pH y temperatura y una determinada concentración de enzimas.²⁰

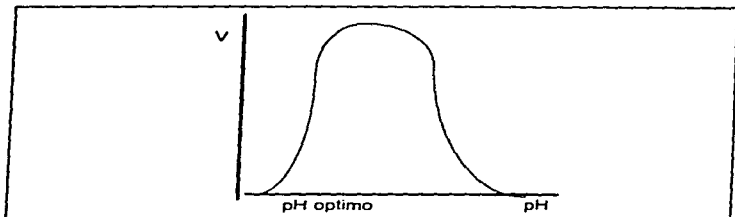


Fig. 7 Efecto del pH en una reacción catalizada por enzimas.

La información cinética (K_m y V_{max}) se puede obtener directamente de una gráfica tipo Michaelis (V contra S), aunque con bastante frecuencia se emplean algunas de las modificaciones algebraicas de la ecuación de Michaelis:

$$1) 1/V = (K_m/V_{max} (1/S)) + (1/V_{max})$$

$$2) V = -K_m (V/S) + V_{max}$$

$$3) S/v = (K_m/V_{max}) + (S/V_{max})$$

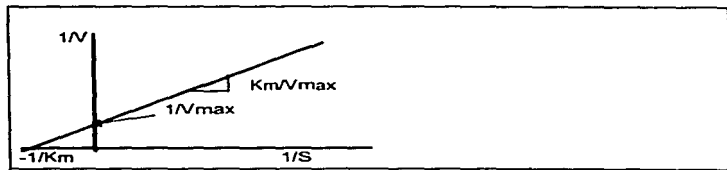


Fig. 8 Representación gráfica de la ecuación de Lineaweaver Burk
 1) $1/V = (Km/V_{m\acute{a}x} (1/S)) + (1/V_{m\acute{a}x})$

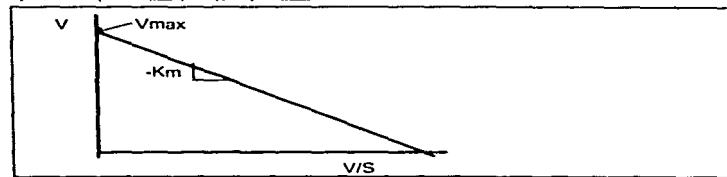


Fig. 9 Representación gráfica de la ecuación de Eadie Hofstee :
 2) $V = -Km (V/ S) + V_{max}$

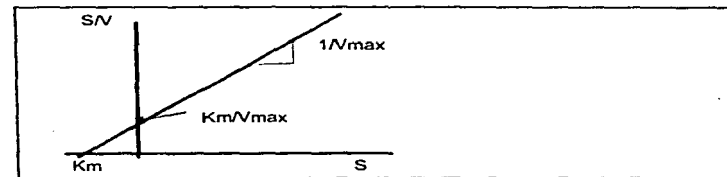


Fig.10 Representación gráfica de la ecuación de Hanes:
 3) $S/v = (Km/V_{m\acute{a}x}) + (S/V_{m\acute{a}x})$

La cinética enzimática que se ha descrito desempeña una función reguladora evidente en el metabolismo: más arriba de un cierto límite, la velocidad de reacción es constante para cualquier concentración de sustrato. Este es el primer medio del que dispone la célula para asegurarse condiciones constantes en un ambiente variable.²⁰

Sin embargo, algunas enzimas presentan "desviaciones" respecto al comportamiento Michaeliano, siendo la más común la inhibición por exceso de sustrato. Existen varias explicaciones a este fenómeno, pero una de las más aceptadas es que la enzima se une al sustrato por varios enlaces, por lo que a concentraciones fuertes dos moléculas de sustrato pueden ocupar un sitio activo, volviéndolo inactivo.²⁰ (ver fig. 11)

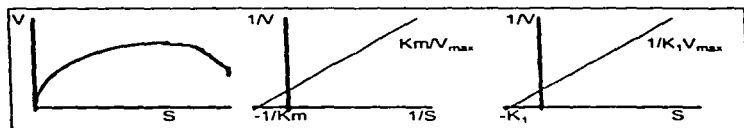


Fig. 11 Inhibición por exceso de sustrato en las representaciones del modelo de Michaelis-Menten y de Lineweaver-Burk, para el modelo:

$$v_o = \frac{V_{max}}{1 + Km/S + S/K_1}$$

$$1/v_o = \frac{1}{V_{max}} + \frac{Km}{V_{max}S} + \frac{S}{K_1V_{max}}$$

Otro caso de desviación de la cinética es el de "activación por el sustrato", que supone la coexistencia equilibrada de dos formas de la enzima, una de las cuales presenta menor actividad. En este caso se observa el comportamiento en la fig. 12

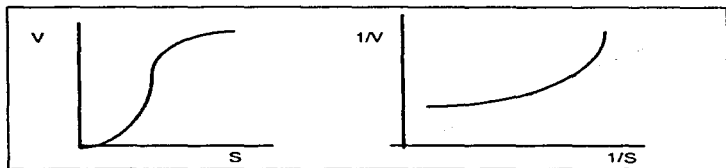


Fig. 12 Desviación de la cinética de Michaelis-Menten por un fenómeno de "activación por sustrato".

Por otra parte, aunque no se le podría considerar específicamente como una desviación de la cinética michaelina, la reversibilidad de las reacciones ocasiona comportamientos que no están descritos en el modelo de Michaelis-Menten. Cuando la reacción caracterizada en la ecuación (1), por la constante K^2 es de consideración, el modelo se transforma en:

$$(6) \quad V_A = \frac{Sv_{max}}{S + K_A (1 + P/K_B)}$$

$$\text{donde: } K_A = \frac{K^{-1} + K^{-2}}{K^{+1}} \quad \text{Y} \quad K_B = \frac{K^{-1} + K^{+2}}{K^{-2}}$$

P = concentración del producto (cuando $P=0$, este modelo se transforma en el de Michaelis-Menten).²⁰

Existen un gran número de sustancias capaces de impedir el desarrollo normal de las reacciones enzimáticas cuando se combinan con las enzimas y gracias al estudio de dichas sustancias, conocidas como inhibidores, se han podido clasificar en un cierto número de casos. Se representa el más sencillo, el de enzimas monoméricas con un solo sustrato que establecen solo un tipo de interacción con el inhibidor. En la fig. 13 se representan y comparan las principales formas de inhibición.²⁰

El papel regulador de los inhibidores enzimáticos es de fundamental importancia en el equilibrio de la actividad y en la economía óptima de las rutas metabólicas.²⁰

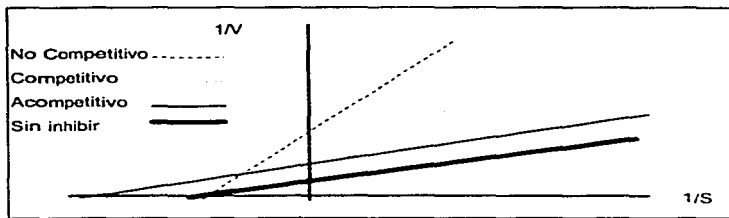
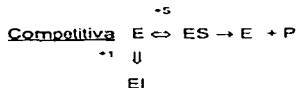
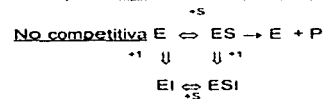


Fig. 13 Principales mecanismos de inhibición y modificaciones a la representación gráfica de Lineweaver-Burk.

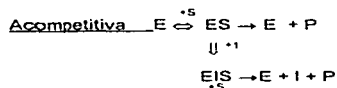
Las ecuaciones de los diferentes mecanismos de inhibición son las siguientes:



$$1/V = (Km/V_{max})(1 + 1/K_i) (1/S) + (1/V_{max})$$



$$1/V = (Km/V_{max})(1 + 1/K_i) (1/S) + (1/V_{max}) (1 + 1/K_i)$$



$$1/V = (Km/V_{max}) (1/S) + (1/V_{max}) (1 + 1/K_i)$$

2. METODOLOGÍA

2.1 OBTENCIÓN DE LA CEPA DE *Penicillium roqueforti*.

La cepa del *Penicillium roqueforti* se aisló de un queso azul comercial (Bleu d'Auvergne). Se tomó 1g. del queso comercial, y se realizaron las siguientes diluciones: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} . De la dilución de 10^{-3} se tomaron alícuotas de 0.1ml que se inocularon en cajas de Petri con agar PDA. Estas cajas se incubaron a 25°C hasta que crecieron las colonias de microorganismos (4 días).

2.2 IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA DE *Penicillium roqueforti*.

Se realizaron cultivos en agar Sabureau con ácido acético al 0.1% para comprobar que el microorganismo fuera el correcto₆ y también se realizó un microcultivo para observar al microorganismo bajo microscopio y así verificar que su morfología coincidiera con la reportada bibliográficamente._{2 y 23} Para mantener la cepa viable hasta el momento de la fermentación, se sembró en un medio de agar Sabureau.

2.3 FORMULACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA LA INDUCCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LIPASAS.

Se preparó un medio de cultivo para el crecimiento del *Penicillium roqueforti*, de tal manera que la producción de biomasa fuera la adecuada. Debido a que la lipasa extracelular del hongo es inducible, el medio de cultivo se formuló de tal manera que contuviera los ácidos grasos de cadena corta que llevan a cabo esta inducción. En la mantequilla se encuentran presentes los siguientes ácidos grasos de cadena corta: butírico, caproico, cáprico y caprílico (C₄, C₆, C₈, C₁₀)_{14, B.4}

Los hongos requieren para su desarrollo y crecimiento de fuentes de energía y otros elementos como nitrógeno, hidrógeno, etc. Por lo general, las fuentes de energía son los carbohidratos.²⁰

Como medio de cultivo pueden ser utilizados productos que no estén definidos químicamente, como son: suero de leche, melazas, agua de remojo de ciertos cereales como maíz o trigo, sebo, aceites, etc. Estos productos presentan la desventaja de que no son de composición constante, su composición varía con el tiempo, el método de obtención utilizado no siempre es el mismo, así como las condiciones de almacenamiento. La gran ventaja que presentan es que por lo general son subproductos de desecho de ciertas industrias, lo que significa bajo costo de adquisición, además de que se eliminan desechos de una manera segura y práctica.²⁰

Para la producción de enzimas del *Penicillium roqueforti*, se realizó una modificación a las formulaciones que Stepaniak et al.,²⁵ Kosikowski,¹⁵ y Jolly (1978) proponen. Dichas formulaciones se basan en el suero de leche remanente de la fabricación de queso:

	Stepaniak	Kosikowski
Suero de leche de quesería	69.0%	80.0 %
Extracto de malta	29.0%	
Peptona	1.0%	
Agar	0.4%	
Grasa	No reportada	20.0 %
Esporas de <i>P. roqueforti</i> .	No reportada	0.02%

pH final 5.5.

La modificación de la formulación anteriormente citada fue la siguiente:

Suero de leche de quesería	94.0%
Dextrosa	4.0%
Peptona caseína	1.0%
Mantequilla	1.0%
Esporas de <i>P. roqueforti</i>	0.1%

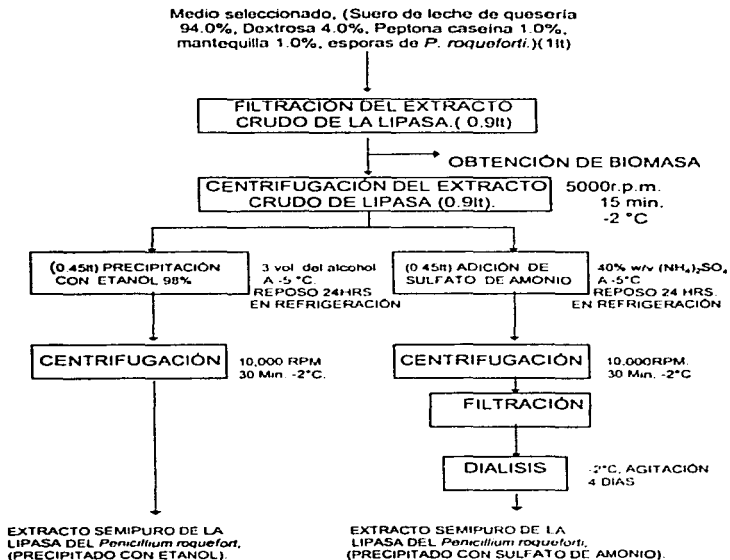
pH final 5.0

2.4. CULTIVO DEL *Penicillium roqueforti* EN EL MEDIO SELECCIONADO PARA LA PRODUCCIÓN DE LIPASAS.

El medio seleccionado, (Suero de leche de quesería 94.0%, Dextrosa 4.0%, Peptona caseína 1.0%, mantequilla 1.0%), se preparó (1lt), se esterilizó, se le adicionaron las esporas del *P. roqueforti* (0.1%) y se dejó a temperatura ambiente (20-25°C) durante 10, 13 y 19 días sin agitación. Con la misma formulación, el medio permaneció en agitación (200 r.p.m) a una temperatura de 20°C durante 13 y 19 días. Al término de dicho tiempo, se procedió a realizar la extracción y la purificación de la lipasa

2.5. EXTRACCIÓN Y SEMIPURIFICACIÓN DE LA LIPASA DEL *Penicillium roqueforti*.

2.5.1 DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN Y SEMIPURIFICACIÓN DE LA LIPASA



2.5.2 DESCRIPCIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE LA LIPASA DEL *Penicillium roqueforti*.

La filtración es un proceso mecánico de separación de partículas sólidas en un medio líquido. En la filtración, el fluido fluye a través de poros pequeños que impiden el paso de las partículas sólidas.¹⁰ Aunque la filtración se ve limitada por el tamaño de la partícula, tiene la ventaja de que no daña el medio de cultivo.

La centrifugación es empleada para separar partículas de diferente densidad que se encuentran suspendidas en un medio líquido.¹⁰

De cada litro de los medios cultivados durante 10,13 y 19 días sin agitación y los de 13 y 19 días con agitación, se realizó una filtración con tres capas de gasa y posteriormente una centrifugación (5000 r p m. durante 15 minutos a -2°C). Obteniéndose aproximadamente 900 ml de extracto crudo que contiene la lipasa extracelular. En esta parte se realizó una determinación de actividad enzimática para comprobar que la lipasa se encontrara presente. (Ver sección 2.6.)

2.5.3. DESCRIPCIÓN DE LA SEMIPURIFICACIÓN DE LA LIPASA DEL *Penicillium roqueforti*.

Existen diferentes formas de realizar una semipurificación o purificación enzimática. Una de ellas es el fraccionamiento con sulfato de amonio, una estrategia que se emplea con gran frecuencia para el aislamiento de proteínas. La incorporación de sulfato de amonio a la solución de proteínas disminuye la solubilidad de éstas. El efecto, que por lo general se conoce como fenómeno de extracción con sal, depende de la concentración de sulfato de amonio incorporado y de la naturaleza de la proteína.⁵

Otras tácticas usadas para el aislamiento de proteínas son la precipitación con solventes orgánicos como la acetona o etanol, el calentamiento ligero a fin de alterar la solubilidad de las proteínas y la precipitación isoeléctrica, que se basa en el hecho de que una proteína tiene solubilidad mínima en un pH correspondiente a su punto isoeléctrico.⁵

En esta parte experimental, se procedió al empleo de etanol y/o sulfato de amonio para la precipitación de las proteínas enzimáticas.

De cada extracto crudo (10,13,19 días sin agitación y 13 y 19 días con agitación), se empleó una mitad (450 ml) para ser precipitada por etanol, y la otra mitad se trató con sulfato de amonio.

Las partes a tratarse con etanol se les adicionó 3 volúmenes de este alcohol a -2°C y sobre un medio frío para controlar la temperatura (-5°C). Las mitades a tratarse con sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), se les adicionó lentamente un 40% (en seco) de esta sal, con agitación constante y también sobre un medio frío (-5°C). Ambas partes se dejaron reposar durante 24 horas en refrigeración (-5°C). Posteriormente se realizó una centrifugación (10,000 r.p.m. durante 30 minutos a -2°C).

A los extractos tratados con etanol se les eliminó el sobrenadante y el precipitado (aproximadamente 15 g) se empleó para determinar la actividad enzimática (ver sección 2.7.).

Los extractos tratados con sulfato de amonio fueron colocados en una membrana para realizar diálisis durante 4 días con cambio de agua y en agitación constante, ya que el uso de membranas semipermeables para la purificación de enzimas se destina generalmente a la eliminación de sales y a la concentración que se realiza en las últimas fases del proceso.²⁷ De esta forma, se obtuvo un extracto semipuro de la enzima que también se mantuvo en congelación para su conservación (aproximadamente 20 ml).

2.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN LOS EXTRACTOS CRUDOS DE LA LIPASA DEL *Penicillium roqueforti*.

Esta determinación se empleó para verificar que la enzima producida en los extractos crudos a diferentes tiempos (10,13,19 días sin agitación y 13 y 19 días con agitación) presentaran actividad enzimática.

La cantidad enzimática se calcula midiendo los ml consumidos de NaOH 0.02N para neutralizar los ácidos grasos liberados o producidos por la reacción de la lipasa del *Penicillium roqueforti*.

2.6.1 PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

El blanco formado con 0.5g de sustrato (mantequilla de leche bronca estéril pH 6-6.5) y 1ml de buffer de fosfatos pH 9 (0.025M) se tituló con NaOH 0.02N.

Posteriormente se prepararon 3 mezclas cada una conteniendo: 0.5g de sustrato más 1 ml de buffer de fosfatos pH 9 y 1ml del correspondiente extracto crudo enzimático (10, 13 y 19 días cultivado sin agitación y 13 y 19 días conservados en agitación durante su cultivo). Una de las mezclas se tituló inmediatamente (t_0). Las dos restantes permanecieron en baño maria a 35°C durante 15 (t_1) y 30 (t_2) minutos y se titularon también con NaOH 0.02N. De esta manera se puede medir la actividad inicial del extracto crudo así como observar el comportamiento de la lipasa con respecto al tiempo, debido a que las lipasas al reaccionar con el sustrato producen la liberación de ácidos grasos mismos que son neutralizados con el NaOH.

2.7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS EXTRACTOS DE LA LIPASA DEL *Penicillium roqueforti* A DIFERENTES CONDICIONES DE pH, TEMPERATURA Y TIEMPO.

Se emplearon los extractos enzimáticos semipurificados de 10 y 13 días (cultivados sin agitación y precipitados con etanol), así como el extracto crudo de 13 días (cultivado sin agitación), y se experimentó a temperaturas de 25,30 y 35°C, a pH de 6, 7,8 y 9 y durante 0, 5, 10, 15, 20 y 30 minutos.

Como se mencionó anteriormente, la actividad enzimática se mide de acuerdo a los ml de NaOH 0.02N necesarios para neutralizar los ácidos grasos liberados o producidos por la lipasa del *Penicillium roqueforti*.

El blanco se formó con 0.15g de sustrato (mantequilla de leche bronca estéril pH 6-6.5) y 2ml de buffer de fosfatos pH 6,7,8 ó 9 (0.025M), mismo que se tituló con NaOH 0.02N.

Del extracto semipuro de 13 días (precipitado con etanol) se tomó 0.1g, se le adicionó 0.15g del sustrato y 2ml de buffer de fosfatos pH 6,7,8, ó 9, se titula con NaOH 0.02N a diferentes tiempos (0,5,10,15,20 y 30 minutos) previamente colocado en baño maría a diferentes temperaturas (25, 30 ó 35°C).

El extracto enzimático crudo de 13 días se empleó de la misma manera que el extracto semipuro de 13 días. Por tener poca cantidad del extracto semipuro (precipitado con etanol) de 10 días, este solo se empleó con las condiciones que Tamio Mase (1994) reporta como óptimas (pH 6 a 8, 30°C y estable por 15 minutos), respetando las cantidades de sustrato, buffer y extracto que se mencionan en el párrafo anterior.

2.8. MEDICIÓN DE LA CANTIDAD DE PROTEÍNA EN LOS EXTRACTOS SEMIPUROS DE LIPASA.

Por el método de Bradford (ver anexo 3) se determinó la cantidad de proteína en los extractos enzimáticos semipurificados (con sulfato de amonio o con etanol).

2.9. METODOLOGÍA DE LA EXPERIMENTACIÓN PARA DETERMINAR PESO MOLECULAR DE LA LIPASA (ELECTROFORESIS SDS-PAGE 12%).

Se realizó una electroforesis (SDS-PAGE) al 12% (Ver Anexo 4) para los extractos enzimáticos semipurificados de 10 y 13 días (cultivados sin agitación y que para su semipurificación se precipitó con etanol) y para el extracto crudo de 13 días (cultivado sin agitación). Se emplearon como patrón de referencia los Pesos Moleculares (Sigma Chemical Co.) correspondientes a las siguientes proteínas: Miosina (Peso Molecular = 205 Kda), β -Galactosidasa (116 Kda), β -Fosforilasa (97 KDa), Albúmina sérica (66 KDa), Albúmina de huevo (45 KDa), Anhidrasa carbónica (29 KDa).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1 OBTENCIÓN DE LA CEPA DEL *Penicillium roqueforti*.

A partir de un queso azul comercial (Bleu d'Auvergne), se pudo aislar la cepa del *Penicillium roqueforti*, misma que se conservó en agar Sabourau.

3.2 IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA DEL *Penicillium roqueforti*.

Se pudo identificar la cepa del *Penicillium roqueforti*, misma que presentó las siguientes características:

El micelio presentó conidióforos, simples, largos, erectos, de forma característica, simétrica o asimétricamente, en forma de escoba. La ramificación múltiple del conidióforo o "pincel" terminó en un grupo de fiáldes con largas cadenas de conidios.

Las colonias extendidas fueron de color verde azulado y luego verde oscuro, aterciopeladas, lisas, al reverso de la caja de petri el color que presentan las colonias son verde muy oscuro, casi negro. Al analizar bajo microscopio se observan penicilios claramente asimétricos, en general con tres o cuatro niveles de ramificación. Tal descripción corresponde a la reportada bibliográficamente,^{2, 23}

3.3 FORMULACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA LA INDUCCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LIPASAS.

El medio de cultivo elegido para inducir la producción de lipasas fue: Suero de leche de quesería (94.0%), Dextrosa (4.0%), Peptona caseína (1.0%), Mantequilla (1.0%) y Esporas de *P. roqueforti* (0.1%). La gran ventaja que presentó es que por ser el suero de quesería un subproducto de desecho industrial, representó un bajo costo de adquisición y producción.

3.4. CULTIVO DEL *Penicillium roqueforti* EN EL MEDIO SELECCIONADO PARA LA PRODUCCIÓN DE LIPASAS.

Los cultivos inductores de lipasa con el medio seleccionado que permanecieron en agitación constante (200 r.p.m.) durante 13 y 19 días presentaron una coloración rosada, textura homogénea y olor dulce. En cambio los que permanecieron sin agitación durante el mismo tiempo su coloración fue amarillenta con una "costra" de color verde característico del *P. roqueforti*, su textura fue similar a una "cuajada" suave y frágil con liberación de líquido y un olor dulce y "picante" o fuerte característico del queso roquefort.

3.5. EXTRACCIÓN Y SEMIPURIFICACIÓN DE LA LIPASA DEL *Penicillium roqueforti*

Durante la extracción de la lipasa de los medios de cultivo se obtuvo aproximadamente 300 ml de extracto enzimático crudo de cada medio (que permaneció durante: 10, 13 y 19 días sin agitación y 13 y 19 días con agitación), a estos extractos crudos se les determinó la actividad enzimática para observar que la lipasa se hubiese producido (20 ml se conservaron en congelación para su futuro empleo).

En la semipurificación se obtuvieron aproximadamente 15 gr de cada extracto precipitado con etanol; en cambio para los que se utilizó el sulfato de amonio se obtuvieron aproximadamente 20 ml. En la semipurificación, al emplear el etanol este fue recuperado durante la centrifugación y el precipitado fue el extracto de lipasa que se empleó para conocer la cantidad de proteína y su actividad enzimática. Por otra parte, durante la semipurificación utilizando el sulfato de amonio y después de la centrifugación, no hubo precipitado sino una película de extracto de lipasa en la superficie que posteriormente se dializó para que se determinara la cantidad de proteína.

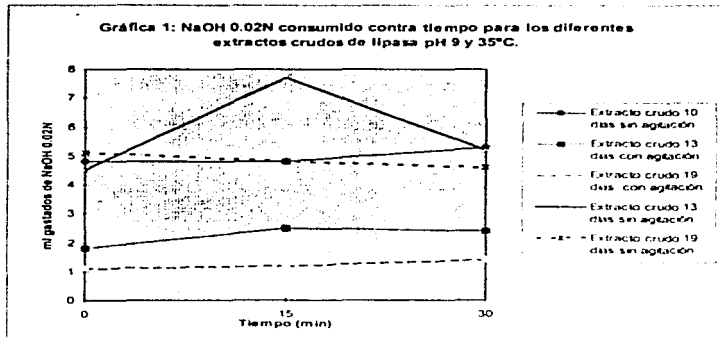
Tamio Mase (1994) indica el empleo de etanol y después sulfato de amonio en la purificación del extracto de lipasa del *Penicillium roqueforti*, pero la secuencia de uso no está claramente definida.

3.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN LOS EXTRACTOS CRUDOS DE LA LIPASA DEL *Penicillium roqueforti*.

TABLA 4. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS CRUDOS pH9 y 35°C.

TIEMPO DE CULTIVO DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO	EXTRACTO ENZIMÁTICO	ml gastados de NaOH 0.02N
t ₀ = 0 min	10 días sin agitación	4.8
t ₁ = 15 min	10 días sin agitación	4.8
t ₂ = 30 min	10 días sin agitación	5.3
t ₀ = 0 min	13 días sin agitación	4.5
t ₁ = 15 min	13 días sin agitación	7.7
t ₂ = 30 min	13 días sin agitación	5.2
t ₀ = 0 min	19 días sin agitación	5.1
t ₁ = 15 min	19 días sin agitación	4.8
t ₂ = 30 min	19 días sin agitación	4.6
t ₀ = 0 min	13 días con agitación	1.8
t ₁ = 15 min	13 días con agitación	2.5
t ₂ = 30 min	13 días con agitación	2.4
t ₀ = 0 min	19 días con agitación	1.1
t ₁ = 15 min	19 días con agitación	1.2
t ₂ = 30 min	19 días con agitación	1.4

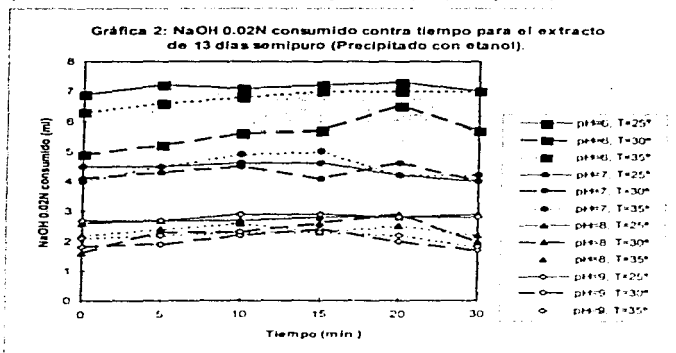
Según la gráfica 1 y los datos de la tabla 4, podemos observar que el extracto crudo enzimático que se cultivó durante 13 días sin agitación, fue el que mayor cantidad de ml de NaOH 0.02N gastó, indicando que tiene mayor actividad al haberse producido más cantidad de ácidos grasos, seguido del extracto que permaneció sin agitación y durante 10 días en cultivo. Por otra parte, el extracto crudo enzimático cultivado durante 19 días y con agitación, fue el que menor cantidad de ml de NaOH 0.02N gastó con respecto a los otros extractos crudos, indicando una menor actividad y baja producción de ácidos grasos, debido a esto, se encuentra posiblemente muy poca cantidad de lipasa detectable en este extracto. Esto nos indica que la agitación o aireación en los medios de cultivo disminuye la producción de lipasa del *Penicillium roqueforti*.



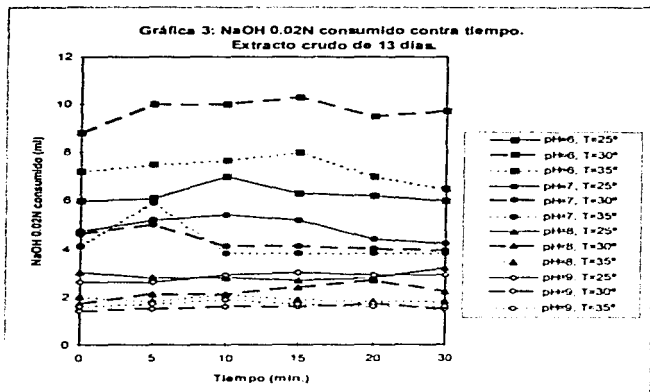
3.7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS EXTRACTOS DE LA LIPASA DEL *Penicillium roqueforti* A DIFERENTES CONDICIONES DE pH, TEMPERATURA Y TIEMPO.

Según la gráficas que se presentan a continuación (2,3, 4 y 5), se observa que la mayor actividad enzimática se presenta en un pH de 6 y a temperaturas de 25° ó 30°C. El extracto semipuro (precipitado con etanol) de 13 días sin agitación a 25°C y un pH 6, la actividad máxima se da a los 20 minutos (gráfica 2); por otra parte el extracto crudo de 13 días sin agitación (gráfica 3) a 30°C y pH 6 la mayor actividad se presentó a los 15 minutos. El extracto crudo enzimático que se cultivó durante 13 días sin agitación, fue el que mayor cantidad de ml de NaOH 0.02N gastó a 30°C y pH 6. El extracto enzimático semipuro (precipitado con etanol) de 10 días sin agitación (gráfica 4) a 30°C y un pH 6 tiene su mayor

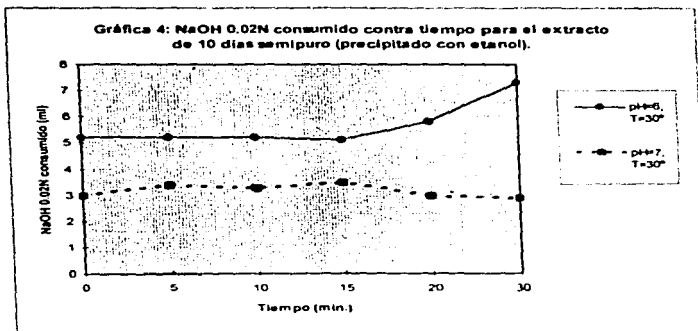
actividad enzimática a los 30 minutos. En general, cualquiera de los extractos enzimáticos analizados presentó la mayor actividad enzimática a pH 6 con cualquier temperatura (25, 30 ó 35°C). La gráfica 5 compara los tres extractos (crudo de 13 días, semipuro de 13 y 10 días) a pH 6 y Temperatura de 30°C.



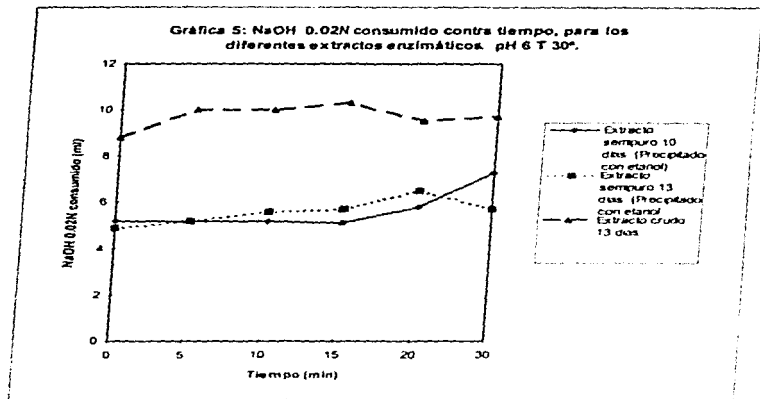
Gráfica 2: La actividad enzimática del extracto semipurificado de 13 días (sin agitación y precipitado con etanol) se midió a diferente pH's (6,7,8 y 9), y a diferentes temperaturas (25, 30 y 35°C) en un lapso de tiempo de 30 minutos, con intervalos de 5 minutos. La mayor actividad enzimática (mayor consumo de NaOH 0.02N) de este extracto se presentó a los 20 minutos, a pH 6 y 25°C.



Gráfica 3: La actividad enzimática del extracto crudo de 13 días (sin agitación) se midió a diferente pH's (6,7,8 y 9), y a diferentes temperaturas (25, 30 y 35°C) en un lapso de tiempo de 30 minutos, con intervalos de 5 minutos. Este extracto consumió la mayor cantidad de NaOH 0.02N a los 15 minutos con un pH 6 y 35°C de temperatura. Se puede observar que las curvas del extracto semipuro de 13 días (gráfica 2) son más homogéneas en comparación al extracto crudo de 13 días (gráfico 3) y esto es debido posiblemente a la interferencia de otros componentes existentes en el extracto crudo.



Gráfica 4: La actividad enzimática del extracto semipuro de 10 días (sin agitación y precipitado con etanol) se midió a diferente pH's (6. y 7), y a 30°C en un lapso de tiempo de 30 minutos, con intervalos de 5 minutos. A pH 6, 30°C y 30 minutos este extracto consumió la mayor cantidad de NaOH. Por tener poca cantidad de este extracto, solo se empleó bajo las condiciones que Tamio Mase (1994) reporta como óptimas.



Gráfica 5: La actividad enzimática del extracto crudo de 13 días (sin agitación) y los extractos semipuros de 13 y 10 días (sin agitación y precipitados con etanol), fue medida a pH 6 y 30°C en un lapso de 30 minutos con intervalos de 5 minutos, observándose un mayor consumo de NaOH en el extracto crudo de 13 días (a los 15 minutos), relacionado posiblemente con los demás componentes presentes en el medio; en cambio los extractos semipuros presentan un consumo menor de NaOH pero la tendencia es parecida.

3.8. MEDICIÓN DE LA CANTIDAD DE PROTEÍNA EN LOS EXTRACTOS SEMIPUROS DE LIPASA.

TABLA 5 RESULTADOS DE LA LONGITUD DE ONDA SEGÚN LA CANTIDAD DE PROTEÍNA PRESENTE EN LOS EXTRACTOS SEMIPUROS DE LIPASA FÚNGICA DEL *Penicillium roqueforti*.

TIPO DE EXTRACTO	Cantidad de proteínas (mg)*	Lectura de Longitud de onda (2.)
Medio* precipitado con etanol	2.58	286
Medio* precipitado con sulfato de amonio	---	---
10 días sin agitación y precipitado con etanol	10.70	335
10 días sin agitación y precipitado con sulfato	7.24	314
13 días sin agitación y precipitado con etanol	17.90	378
13 días sin agitación y precipitado con sulfato	6.58	310
19 días sin agitación y precipitado con etanol	1.58	280
19 días sin agitación y precipitado con sulfato	4.75	299
13 días sin agitación y sin precipitar (crudo)	7.41	315
13 días con agitación y precipitado con etanol	---	---
13 días con agitación y precipitado con sulfato	---	---
19 días con agitación y precipitado con etanol	---	---
19 días con agitación y precipitado con sulfato	---	---

* Obtenido al sustituir el valor de λ en la ecuación para obtener la cantidad de proteína en los extractos (ver anexo 3).

* Refendo al medio formulado (ver sección 3.3), pero sin la adición de microorganismo para la producción de lipasa

--Cantidad de proteína menor no detectable por la técnica empleada

A partir de los datos experimentales reportados en la tabla 5, se puede observar que el extracto enzimático que permaneció en cultivo durante 13 días, sin agitación y que para su semipurificación se precipitó con etanol, presentó la mayor cantidad de proteína según el método de Bradford (17.9 mg). El extracto que permaneció durante 10 días en cultivo, sin agitación y que se precipitó con etanol, presentó una cantidad de proteína similar al cultivo de trece días (10.7mg).

El extracto crudo de 13 días (sin agitación) fue el tercero que presentó mayor cantidad de proteína según la técnica empleada (7.41 mg). En cambio, en los extractos precipitados con sulfato de amonio y en los que permanecieron en agitación durante su cultivo, las lecturas de longitud de onda fueron menores a las de la curva patrón, por lo que la cantidad de proteína no fue detectable por este método; se recomienda emplear otro método más sensible para cuantificar las proteínas presentes en dichos extractos.

3.9. DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DE LA LIPASA (ELECTROFORESIS SDS-PAGE 12%)

3.9.1 CURVA PATRÓN

Esta se realizó con los Pesos Moleculares conocidos que corresponden a:

Miosina, β Galactosidasa, β fosforilasa, Albúmina sérica, Albúmina de huevo y Anhidrasa carbónica.

TABLA 6 RESULTADOS DE Log DE PESOS MOLECULARES DE ENZIMAS CONOCIDAS CONTRA LA MOVILIDAD RELATIVA DE LAS PROTEÍNAS (Rf)

NOMBRE DE LA ENZIMA	PESO MOLECULAR (PM = KDa)	Log PM (")	DISTANCIA DE LA BANDA DE PROTEÍNA (dp=cm)	Rf = dp/dt (")
Miosina	205	2.311	0.8	0.163
β Galactosidasa	116	2.064	1.4	0.286
β Fosforilasa	97	1.986	1.7	0.347
Albúmina sérica	66	1.819	2.2	0.449
Albúmina de huevo	45	1.653	3.3	0.673
Anhidrasa carbónica	29	1.462	3.6	0.735

Donde: Rf = Movilidad relativa, y dt =Distancia total de tinción, para este caso dt = 4.9cm

Análisis de Regresión Lineal

b= 2.473

m= -1.335

r= -0.984

Ecuación que permite conocer el Peso Molecular (PM) de los extractos enzimáticos según su Movilidad Relativa (Rf):

$$\log PM = (-1.335(Rf)) + 2.473$$

Antilog PM= PM

GRÁFICA 6: CURVA PATRÓN DE Log PM CONTRA MOVILIDAD RELATIVA (Rf)

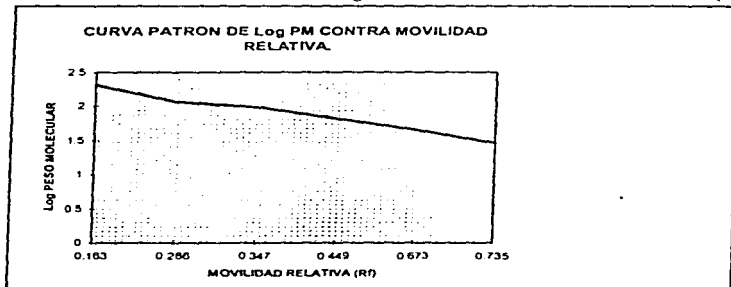


TABLA 7. RESULTADOS DEL PESO MOLECULAR DE LOS EXTRACTOS SEMIPURIFICADOS DE LIPASA FÚNGICA DEL *Penicillium roqueforti* SEGÚN LA MOVILIDAD RELATIVA (Rf) QUE SE ALCANZO EN UN GEL DE POLIACRILAMIDA AL 12%. (SDS-PAGE 12%)

EXTRACTO	DISTANCIA DE LAS BANDAS DE PROTEÍNA (dp=cm)	Rf = dp/dt	log PM	Peso Molecular ^ (PM= KDa)
10 días sin agitación semipurificado con etanol (3 bandas)	2.1	0.428	1.902	79.799
10 días sin agitación semipurificado con etanol (3 bandas)	2.5	0.510	1.792	61.944
10 días sin agitación semipurificado con etanol (3 bandas)	3.7	0.755	1.465	29.174
13 días sin agitación semipurificado con etanol (2 bandas)	2.0	0.408	1.928	84.723
13 días sin agitación semipurificado con etanol (2 bandas)	3.7	0.755	1.465	29.174
Medio(suero + mantig quilla + peptonas caseína + dextrosa) precipitado con etanol (3 bandas)	2.1	0.428	1.902	79.799
Medio(suero + mantig quilla + peptonas caseína + dextrosa) precipitado con etanol (3 bandas)	2.7	0.551	1.737	54.576
Medio(suero + mantig quilla + peptonas caseína + dextrosa) precipitado con etanol (3 bandas)	4.2	0.857	1.329	21.330
Extracto crudo de 13 días (1 banda)	3.7	0.755	1.465	29.174

Donde: Rf = Movilidad relativa, y dt = Distancia total de tinción, en este caso dt = 4.9cm
 ^ Obtenido al sustituir el valor de Rf en la ecuación para obtener el Peso Molecular de los extractos enzimáticos (ver sección 3.9.1).

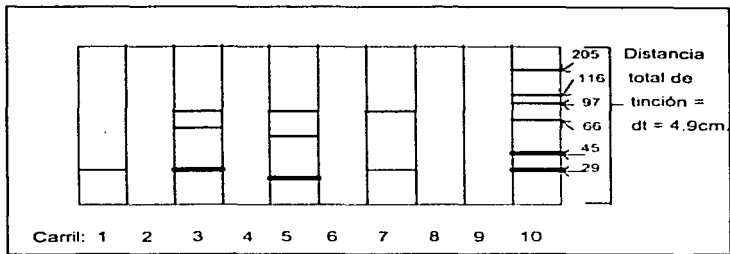


Fig. 14. Diagrama representativo de las bandas de proteínas de la lipasa del *P. roqueforti* en un gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE 12%).

El carril 1 contiene el extracto crudo de 13 días sin agitación; el carril 3 el extracto de 10 días sin agitación y semipurificado con etanol; el carril 5 el medio (suero + mantequilla + peptona caseína + dextrosa) precipitado con etanol; el carril 7 el extracto de 13 días sin agitación y semipurificado con etanol y por último, en el carril 10 los pesos moleculares (Sigma Chemical Co.)

Como se observa en la figura anterior, se presenta una banda común entre el extracto crudo de 13 días (sin agitación) -carril 1-, el extracto semipuro de 10 días (sin agitación y precipitado con etanol) -carril 3-, y el extracto semipuro de 13 días (sin agitación y precipitado con etanol) -carril 7-, la cual no se encuentra en el medio semipurificado (carril 5). El extracto de 10 días (carril 3) presenta una banda que no corresponde ni al medio ni a los otros extractos. La banda común presente en los carriles 1, 3 y 7 tiene un peso molecular de 29.174 KDa. La que se supone corresponde a la lipasa, porque además coincide en la actividad enzimática medida (ver sección 3.7).

Se realizaron varias electroforesis en donde se colocaron las diferentes muestras de extractos de lipasas y los respectivos medios de control. Se eliminaron los extractos de 13 y 19 días con agitación y semipurificados con etanol y sulfato de amonio, así como los extractos enzimáticos de 10, 13 y 19 días sin agitación pero semipurificados con sulfato de amonio, debido a que las bandas que se percibían correspondían a las del medio (Suero + mantequilla + dextrosa + peptona caseína) precipitado con etanol (para evitar que las bandas de proteína no se apreciaran adecuadamente). Por lo tanto, los extractos de 10 y 13 días sin agitación y semipurificados con etanol fueron los únicos que presentaron bandas ajenas al medio control o a los extractos enzimáticos crudos. Esta respuesta concuerda con los resultados obtenidos al haber determinado las proteínas por el método de Bradford, en donde dichos extractos (10 y 13 días sin agitación y semipurificados con etanol) presentan la mayor cantidad de proteína (10.7 y 17.9 mg respectivamente Ver tabla 5).

A partir de los datos experimentales reportados en la tabla 7, se puede observar que el extracto enzimático que permaneció en cultivo durante 10 días, sin agitación y que para su semipurificación se trató con etanol, presentó una banda bien definida (diferente a la del medio control) al realizar la electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12%. A dicha banda le corresponde un peso molecular de 29.174 KDa. El extracto que permaneció durante 13 días en cultivo, sin agitación y que se semipurificó con etanol, así como su extracto crudo (es decir, sin semipurificar pero bajo las mismas condiciones de tiempo), presentaron también una banda a la que le corresponde el mismo peso molecular (29.174 KDa), pero dichas bandas no se aprecian con tanta claridad como ocurre en el extracto de 10 días. El medio control presenta una banda de peso molecular de 21.330 KDa que posiblemente correspondiente a β lactoglobulina de suero vacuno₃₁, pero no presenta la banda de peso molecular a 29.174 KDa, por lo que se concluye que esta última presente en los otros extractos pertenece a la lipasa. Tamio Mase₁₅ (1994) determinó el peso molecular a una lipasa extracelular del *Penicillium roqueforti* IAM 7268 encontrando que era de 25 KDa.

CONCLUSIONES.

- 1** Se logró aislar la cepa del *Penicillium roqueforti* a partir de un queso azul comercial.
- 2** Se identificaron las características de la cepa del *Penicillium roqueforti*, mismas que coincidieron con lo reportado bibliográficamente.
- 3** El medio de cultivo elegido para inducir la producción de lipasas fue: Suero de leche de quesería (94.0%), Dextrosa (4.0%), Peptona caseína (1.0%), Mantequilla (1.0%) y Esporas de *P. roqueforti* (0.1%).
- 4** Las condiciones obtenidas para la obtención de la lipasa a partir del *Penicillium roqueforti* fueron: Medio a base de suero (ver formulación anterior) durante 10 y/o 13 días a temperatura ambiente y sin agitación., implicando que la producción de la enzima se realiza en corto tiempo y a bajo precio, debido a que se usa como materia prima un producto de desecho en las industrias lácteas (suero) y no hay un costo extra por empleo de energía eléctrica, debido a que no es necesario agitar el cultivo en la producción de lipasas.
- 5** De un litro de medio para producir lipasas, se obtuvo aproximadamente 15 gr. del extracto semipurificado de 13 días sin agitación y precipitado con etanol; y 20ml aproximadamente en los extractos semipurificados con sulfato de amonio.
- 6** Si hubo presencia de actividad enzimática en los extractos crudos de la lipasa utilizando el medio de cultivo formulado siendo los extractos de 13 y 10 días (sin agitación) los que mayor cantidad de NaOH 0.02 N consumieron.

7 Las condiciones óptimas para la actividad enzimática en los extractos de lipasa de 10 y 13 días sin agitación y semipurificados con etanol, así como para el extracto crudo de 13 días fueron de pH 6 y temperaturas entre 25 y 30°C. El extracto enzimático crudo de 13 días presentó mayor actividad enzimática que los extractos enzimáticos semipurificados de 10 y 13 días. Por lo que se concluye que se debe estudiar con mayor detalle la forma de purificar la enzima.

8 Según el método de Bradford los extractos semipuros de 13 y 10 días (precipitados con etanol y sin agitación) así como el extracto crudo de 13 días (sin agitación) presentaron la mayor cantidad de proteína (17.9 mg, 10.7mg y 7.41mg respectivamente). Para los demás extractos (semipurificados con sulfato de amonio) se recomienda emplear otro método más sensible.

9 Se presentó una banda de 29.174kDa en la electroforesis (SDS-PAGE 12%) para los diferentes extractos enzimáticos (10 y 13 días semipurificados con etanol y sin agitación, así como el extracto crudo de 13 días sin agitación) mismo que corresponde a la lipasa producida por el *Penicillium roqueforti*

ANEXO 1

ELABORACIÓN DEL QUESO AZUL.

1. PREPARACIÓN DE LA LECHE (8:00 A.M.)

Separar de la leche cruda o bronca de cabra la mantequilla y la leche. Pasteurizar o calentar la leche por HTST (High temperature and short time), enfriarla a 30°C y bombearla hasta la cuba. (También la leche puede usarse en su forma cruda, pero es más peligroso por la contaminación microbiana presente.)

Opcionalmente se puede blanquear la mantequilla incorporando peróxido de benzoilo en cantidades legales permitidas y calentar a 145°F por 30 minutos. Homogeneizar la mantequilla caliente a 500 psi en un primer paso y después a 1000 psi en un segundo paso; enfriarla a una temperatura óptima (20°C) e incorporarla en la cuba donde se encuentra la leche. La gran área superficial creada por la homogeneización aumenta la acción de las lipasas.

Agregar 0.5% de cultivos lácticos iniciadores activos y permitir una ligera acidificación durante 30°C por una hora. No se adiciona annato como colorante, pero si el blanqueo químico no se practica se puede adicionar un poco de clorofila alcalina en solución o tinte verde grado alimenticio No 4, en cantidades suficientes para neutralizar el color amarillento ocasionado por la grasa. (1a2 onzas de clorofila por cada 1000 libras de leche).

Después del periodo de acidez, se agita y se adiciona extracto de renina (72 ml por cada 1000 lb de leche entera). (Diluir previamente el extracto de renina 1:40 con agua purificada). Mezclar bien durante 3 minutos, cubrir la cuba y dejar en reposo. Una buena cuajada se debe formar en 30 minutos.

2. CORTADA DE LA CUAJADA. (10:00 A.M.)

Quando la cuajada es firme, se corta en cubos con las cuchillas estandar (5/8 de pulgada).

3. COCCIÓN DE LA CUAJADA (10:15 A.M.)

Dejar los cubos en reposo durante 5 minutos, después agitarlos suavemente una vez cada 5 minutos: hasta que la acidez titulable del suero no varíe en un 0.03% (por ejemplo de 0.11 a 0.14% de suero). La acidez máxima ocurre en aproximadamente una hora y durante este tiempo la temperatura debe permanecer a 30°C. Justo antes del drenado, se eleva la temperatura a 33.3°C y se mantiene así durante 2 min. Después, retirar parte del suero que se libere.

4. DRENADO DEL SUERO (11:15 A.M.)

Colocar un filtro de metal en forma vertical en la puerta de salida. Empujar la cuajada en el suero sobre las paredes de la cuba con un rastrillo. Drenar todo el suero y presionar gentilmente sobre la cuajada. Alternativamente se puede emplear un tubo cilíndrico perforado de acero inoxidable donde la mezcla de suero y cuajada se bombea y al pasar se separa el suero de la cuajada en forma continua.

5. INOCULACION DE LAS ESPORAS DE *Penicillium roqueforti*. (11:30 A.M.)

Mezclar a mano o empleando un difusor de sal seca por vibración electrónica 2 lb de sal en grano y 4 cucharadas soperas (1oz) de esporas de *Penicillium roqueforti* en polvo por cada 100 lb de cuajada. Agitar mecánica o manualmente la sal y el polvo sobre la cuajada durante 5 min. Lipasas en polvo de grado alimenticio pueden ser introducidas en pequeñas cantidades en esta etapa, para un desarrollo de sabor más rápido.

6. INMERSIÓN DE LA CUAJADA (11:45 A.M.)

Colocar la cuajada parcialmente salada e inoculada sobre un molde circular para queso azul de acero inoxidable. Estos aros no tienen base y están colocados sobre una mesa de bambú o red de nylon. Llenar los moldes hasta el tope; después no adicionar nada más.

7. MOLDEADO DE LA CUAJADA (12:00 P.M.)

Girar los aros completamente cada 15 min. durante las primeras dos horas. Después, durante el resto de la tarde solo dos veces más. Dejarlos drenar toda la noche a temperatura ambiente (22-23°C) no colocar ninguna presión sobre ellos, pero si colocar material que los proteja como papel o telas.

8. SALADO FINAL (UN DÍA DESPUÉS 8:00 A.M.)

Con una espátula remover los casi 2.5 kg de la cuajada de los aros. Golpear suavemente el molde de metal sobre una mesa para que el queso se libere. Colocar las ruedas de queso sobre una mesa o bolsa con sal en grano y cubrir las superficies liberadamente con sal. Eliminar los excesos y colocar gentilmente las ruedas de queso sobre sus lados curvados sobre unas repisas especiales de madera en un almacén a 15.6°C y una humedad relativa de 85%. Esto evita que las ruedas pierdan su forma original.

Repetir este tipo de salado durante 5 días (4 veces más). Al final de este periodo, la superficie del queso será muy dura.

Alternativamente se pueden colocar las ruedas dentro de una salmuera al 23% durante 24-48 hrs. Se secan y se salan las superficies deliberadamente durante 3 días, de esta manera el queso contendrá aproximadamente 4% de sal.

9. ENCERADO Y FORMACIÓN DE HOYOS CON PINCHADURAS (6 DÍAS DESPUÉS, 9:00 A.M.)

Después de 5 o 6 días de haber salado el queso y haberlo lavado, sumergir el queso limpio en una cuba o tina a temperatura baja, adicionarle cera amarilla que se encuentre a 76°C por 7 segundos. (En lugar de cera se puede utilizar una película de plástico Cryovac). Remover las ruedas de la tina y dejar que sequen, después, perforar las ruedas una por una, por los dos lados, puede realizarse esto último con una perforadora mecánica con múltiple cantidad de agujas con el fin de realizar 54 hoyos de un solo golpe y penetrar hasta el fondo del queso. No hacer los hoyos muy gruesos.

10. CURADO O MADURACIÓN (6 - 8 DÍAS DESPUÉS, 9:00 A.M.)

Colocar las ruedas de queso enceradas en unas cunas o repisas especiales de madera, evitando que se resbalen y sobre los lados curvados, dentro de un almacén, éste deberá mantener una humedad relativa de 95% y una temperatura de 10 a 11°C. Dejar las ruedas de queso durante 60 ó 120 días, hasta que el moho crezca completamente, generalmente en 10 días inicia su crecimiento.

11. LIMPIADO Y ALMACENADO (36-120 DÍAS DESPUÉS)

Finalmente, limpiar las ruedas de queso, secarlas y cubrir las con papel aluminio o película plástica y mantener en refrigeración a 2.2°C. Continuar la maduración o distribuir.

El queso mantenido bajo refrigeración y un buen empaque, puede permanecer en buenas condiciones por más de dos meses. Se debe consumir a 7-10 °C en porciones pequeñas o desmoronarlo, para su mejor percepción de sabores.

ANEXO 2
NORMA DE CALIDAD PARA EL QUESO DANABLU,

1.- NOMBRE DEL PRODUCTO

Queso danablu.

2.- OBJETO DE LA NORMA.

Definir aquellas condiciones y características que debe reunir el producto para su adecuada comercialización en el mercado nacional.

3.- ÁMBITO DE LA APLICACIÓN.

La presente norma se aplicará al queso de leche de vaca denominado "Danablu", que habrá de cumplir con los requisitos establecidos en esta norma.

4.- DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO.

4.1 Tipo: semiblando a blando.

4.2. Formas:

4.2.1 Cilíndrica.

4.2.2. Prismática de base cuadrada.

4.2.3. Prismática de base rectangular.

4.3. Dimensiones:

4.3.1. Los de forma cilíndrica tendrán 20 cm de diámetro, aproximadamente.

4.3.2. Los de forma prismática de base cuadrada tendrán una longitud y una anchura de 21 cm, aproximadamente.

4.3.3. Los de forma prismática de base rectangular tendrán una longitud y una anchura aproximadamente de 30 cm y 12 cm, respectivamente.

4.4. Pesos:

4.4.1. Los de forma cilíndrica, de 2750 a 3250 gr.

4.4.2. Los de forma prismática 4000 gr. aproximadamente.

4.5. Corteza:

4.5.1 Consistencia: el queso "Danablu" no tiene en realidad corteza alguna, sino una superficie semiblanda

4.5.2. Aspecto: grasiento a seco.

4.5.3. Color: blanquizco.

4.6. Pasta:

4.6.1 Textura: fácil de cortar y untar.

4.6.2. Color: blanco, con vetas azules-verdes mohosas.

4.7. Ojos:

4.7.1. Números: escasos.

4.7.2. Forma: agujeros y grietas irregulares.

4.7.3. Tamaño: variable.

4.7.4. Aspecto: mohoso.

4.8. Otras características: Se recomienda que el queso "Danablu" no se consuma hasta que no tenga, por lo menos, seis semanas de maduración, para que haya alcanzado todas sus características organolépticas.

5.- PROCESO DE FABRICACIÓN.

5.1. Coagulación: por cuajo u otras enzimas coagulantes autorizados.
5.2 Tratamiento térmico: Ninguno, o se calienta ligeramente la cuajada después de la cortada.

5.3. Fermentación: por adición de fermentos lácticos

5.4. Maduración: se saladra con agujas para fomentar el desarrollo de los hongos. Se almacena húmedo, a una temperatura que oscila de 2 a 12°C.

5.5. Salado: Se sala en seco.

6. FACTORES ESENCIALES DE COMPOSICIÓN Y CALIDAD.

6.1 Materias primas: leche de vaca pasteurizada

6.2. Materia grasa: Un mínimo del 50 % en el extracto seco.

6.3. Humedad: un máximo del 47%.

7. ADICIONES.

7.1. Necesarias:

7.1.1 Cultivos de bacterias inocuas productoras de ácido láctico (fermentos lácticos).

7.1.2. Mohos característicos de la variedad (*Penicillium roqueforti*).

7.1.3. Cuajos u otras enzimas coagulantes autorizados.

7.2. Facultativas:

7.2.1. Cloruro sódico: un máximo de 200 mg/kg de leche.

7.2.2. Nitrato de sodio y potasio: un máximo de 200 mg/kg de leche.

7.2.3. Agua.

8.- HIGIENE.

El tratamiento de le leche, la fabricación, maduración y manipulación del producto se harán de modo que quede perfectamente garantizado el cumplimiento de las disposiciones sanitarias vigentes y la higiene del producto.

9. ETIQUETADO Y MARCADO.

Cada pieza lista para el consumo irá debidamente etiquetada y marcada, con caracteres bien visibles e indelebles, con las siguientes indicaciones:

a) "Danablu".

b) Cuando se trate de quesos importados, el nombre del fabricante y el del país productor.

c) En los quesos de fabricación nacional, el nombre y la dirección de la entidad productora, su número de registro en la Dirección General de Sanidad y el lugar de fabricación.

ANEXO 3
DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DE BRADFORD.

1. FUNDAMENTOS DEL MÉTODO DE BRADFORD PARA DETERMINAR CANTIDAD DE PROTEÍNAS.

Debido a que el contenido de proteína es el punto de referencia más importante para la determinación de la actividad específica de una preparación enzimática, existen diversos métodos para determinarla. El empleado en este caso es el método de Bradford o Tinción de Proteínas, que se basa en la absorción máxima del Azul brillante de Coomassie G250 entre 465 a 595 nm, lo cual ocurre cuando se han teñido las proteínas.,,

2. REACTIVO DE BRADFORD PARA DETERMINAR LA CANTIDAD DE PROTEÍNAS.

100 mg Azul Brillante de Coomassie G250

50 ml Etanol 95% w/v

100 ml H₂PO₄ (ácido fosfórico) 85% w/v

llevar a 1 lt con agua destilada. Conservar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

3. CURVA PATRÓN

Albúmina bovina al 1 % (1g/100ml)

Tubo	Albúmina	Agua destilada	
1	0.1 ml	0.9 ml	
2	0.2 ml	0.8 ml	+ 5 ml del reactivo de Bradford
3	0.4 ml	0.6 ml	agitar, incubar a Temperatura
4	0.6 ml	0.4 ml	ambiente y leer a 595 nm de
5	0.8 ml	0.2 ml	absorbancia en un especto-
6	1.0 ml	0.0 ml	folómetro (λ).
Blanco	0.0 ml	1.0 ml	

TABLA 8: RESULTADOS DE LONGITUD DE ONDA vs. CANTIDAD DE PROTEÍNA
CURVA PATRON.

ALBUMINA 1% (ml)	Cantidad de Proteína (mg)	Longitud de onda (λ)
0.1	1	274
0.2	2	280
0.4	4	298
0.6	6	312
0.8	8	318
1.0	10	327

Análisis de Regresión Lineal:

$b = 270.45 (\lambda)$

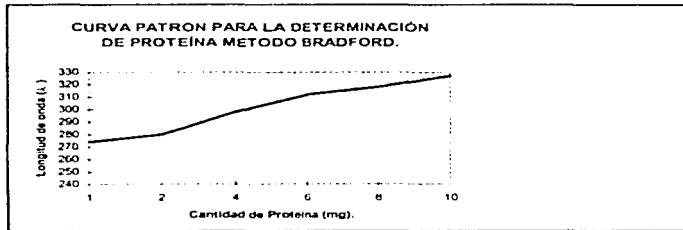
$m = 6008.21 (\lambda/\text{mg})$

$r = 0.9849$

Ecuación para obtener la cantidad de proteína de los extractos:

$$\text{Cantidad de proteína (mg)} = \frac{\text{Lectura de longitud de onda } (\lambda) - 270.45 (\lambda)}{6008.21 (\lambda/\text{mg})}$$

GRÁFICA 7: CURVA PATRÓN DE LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD.



ANEXO 4. FUNDAMENTOS, REACTIVOS Y METODOLOGÍA PARA REALIZAR ELECTROFORESIS.

1.-FUNDAMENTOS.

La electroforesis se basa simplemente en la aceleración de las partículas cargadas en un campo eléctrico, a las que se opone la fricción debida al paso de las partículas a través del medio que las rodea, de modo que se mueven a una velocidad constante proporcional a su carga. Los cationes se mueven hacia el cátodo y los aniones hacia el ánodo. El paso de corriente a través de una solución viene descrito por la ley de Ohm: $V = (R)(I)$, donde V es el voltaje, R la resistencia e I es la intensidad de corriente y en la práctica se produce un aumento de la intensidad aumentando el voltaje. Como los iones transportan la corriente, la migración aumentará al aumentar su intensidad.³³

El calor producido, que depende del voltaje aplicado, puede ocasionar una serie de efectos indeseables tanto en las técnicas analíticas como en las preparativas

- a) Cambios en la densidad, que producen corrientes de convección.
- b) Disminución de la viscosidad, que hace que aumente la difusión, afectando al poder de resolución.
- c) Aumento de la conductividad, aunque esto se puede evitar utilizando una fuente de poder que funcione a una intensidad constante
- d) La evaporación de compuestos volátiles puede hacer que cambie el pH, la fuerza iónica y la conductividad, y también puede dar lugar a un flujo de agua desde los electrodos, produciendo una acumulación de sales cerca del centro del campo eléctrico.
- e) Desnaturalización de las enzimas termolábiles.³⁰

En general, las soluciones con fuerza iónica alta provocan la disminución de la movilidad comparadas con las de fuerza iónica baja, aunque las primeras dan bandas o zonas más discretas. El pH tiene un efecto dramático en la movilidad de las enzimas en un campo eléctrico. Las proteínas son zwitteriónicas y por tanto existen en tres formas iónicas, dependientes del punto isoeléctrico (pI) de la proteína y del pH de la solución. Una proteína a un pH igual al pI deberá ser eléctricamente neutra ($\text{NH}_3^+ \text{RCOO}^-$) y no migrará en un campo eléctrico. Si el medio es ácido respecto a su pI, la proteína estará cargada positivamente ($\text{NH}_3^+ \text{RCOOH}$) y si es básico estará cargada negativamente ($\text{NH}_2 \text{RCOO}^-$).³⁰

De esta manera, la técnica electroforética, explota las diferencia en los valores de pI de las proteínas. Como medio de sostén se emplea el gel de poli(acrilamida o agarosa gelificada en forma de cilindro o placa. En un principio, el gel se prepara en una solución que contiene una mezcla de sustancias de bajo peso molecular llamadas anfólitos. Al aplicar voltaje, los diferentes materiales anfóliticos migran de tal modo que forman un gradiente lineal de pH a lo largo del gel. Luego se aplica la muestra de proteínas en la parte superior del gel y se vuelve a aplicar voltaje. Conforme las proteínas migran en el gel, cada una va encontrando un medio de pH cambiante, de modo que ocurre una titulación conforme va cambiando la carga neta de cada proteína al pasar dicha proteína de una posición a otra con distinto pH en el gel. Esa titulación ocurre hasta que cada proteína llega a una posición de pH en la que la proteína queda titulada en su punto isoeléctrico. Como en dicho punto no hay carga positiva o negativa, la proteína deja de moverse. El resultado es la concentración de cada proteína de la mezcla original en una banda muy bien definida. Para una banda de una enzima o proteína, se puede determinar su peso molecular (en el caso que se desconozca), con un patrón de pesos moleculares.²¹

2.- REACTIVOS¹⁷:

A) Monómero de Acrilamida/Bis (30% T, 2.67%C)

29.2 g Acrilamida

4.0 g N'-N'-Bis metilen-acrilamida.

100 ml Agua destilada.

Filtrar y almacenar a 4°C en oscuridad (30 días como máximo)(Manejar con guantes).

b) Buffer Tris-HCl 1.5M pH 8.8

18.15g Tris base.

Aprox. 50 ml de agua destilada. Ajustar el pH 8.8 con HCl 1N. Llevar a 100 ml con agua destilada, filtrar y almacenar a 4°C.

c) Buffer Tris-HCl 0.5M pH 6.8

6.0 g Tris base

Aprox. 50 ml de agua destilada. Ajustar el pH 6.8 con HCl 1N. Llevar a 100 ml con agua destilada, filtrar y almacenar a 4°C.

d) SDS (Dodecilsulfato de sodio) 10%

Disolver 10g de ADA en 30 ml de agua destilada con suave agitación, llevar a 100 ml con agua destilada. Filtrar y guardar a temperatura ambiente.

g) Persulfato de Amonio al 10% Fresco. (Preparar 1 ml cada vez que se corre la electroforesis).

h) TEMED (N'N'N' Tetrametiletilendiamina). Conservado en refrigeración.

g) Glicerol

h) Solución digestora: (conservar a temperatura ambiente)

3.8 ml de agua destilada.

1.0 ml de Buffer Tris-HCl 0.5M pH 6.8

0.8 ml de Glicerol.

1.6 ml de SDS 10%

0.4 ml de 2 β -mercaptoetanol.

0.4 ml de azul de bromofenol 0.05% (W/V).

i) Buffer de corrimiento pH 8.3 (diluido, listo para usarse).

3.0 g Tris base.

14.4 g Glicina

1.0 g SDS

Llevar a un litro con agua destilada, filtrar y conservar a temperatura ambiente. **No**

ajustar el pH con ácidos o bases.

j) Solución Teñidora madre

1g de azul de coomassie R250

Llevar a 100 ml con agua destilada

k) Solución Teñidora

62.5 ml de Solución teñidora madre.

250.0 ml de Metanol.

50.0 ml de Ácido acético

137.5 ml de Agua destilada.

l) Solución desteñidora Uno

250.0 ml de Metanol

50.0 ml de Ácido acético.

200.0 ml de Agua destilada.

m) Solución desteñidora Dos

25.0 ml de Metanol

35.0 ml de Ácido acético.

440.0 ml de Agua destilada.

n) Solución para desecar el gel.

Glicerol al 5% v/v

3.- PREPARACIÓN DE GELES

aa) Gel concentrador 4% Tris 0.125 M pH 6.8

6.1 ml de Agua destilada

2.5 ml de Buffer Tris-HCl 0.5M pH 6.8

0.1 ml de SDS 10%

1.3 ml de Monómero de Acrilamida-Bis

0.05 ml de Persulfato de amonio* fresco 10%

0.005 ml de TEMED*

Total de monómeros: 10 ml

bb) Gel separador Tris 0.375 M pH 8.8

Tabla 9. Relación de cantidad de reactivos necesarios para preparar geles de acrilamida en diferentes concentraciones (PAGE).

Reactivo	7.5% PAGE	10% PAGE	12% PAGE	15% PAGE
Agua destilada	48.50 ml	40.10 ml	33.50 ml	23.50 ml
Buffer Tris-HCl pH 8.8	25.00 ml	25.00 ml	25.00 ml	25.00 ml
SDS 10%	1.00 ml	1.00 ml	1.00 ml	1.00 ml
Monómero de Acrilamida-Bis	25.00 ml	33.40 ml	40.00 ml	50.00 ml
Persulfato de amonio* 10%	0.50 ml	0.50 ml	0.50 ml	0.50 ml
TEMED*	0.05 ml	0.05 ml	0.05 ml	0.05 ml
Total de monómeros	100.0 ml	100.0 ml	100.0 ml	100.0 ml

* Adicionarlos momentos antes de verter en el equipo "sandwich" para elaboración de geles de electroforesis.

4. PREPARACIÓN DE MUESTRAS:

Las muestras de enzimas o proteínas, se pueden emplear de dos formas digeridas o no digeridas. A las muestras no digeridas se les adiciona glicerol (1:1). Para las muestras a digerir, se utiliza la solución digestora (h) en relación 1:1, posteriormente las muestras se colocan en baño maría, a 90°C durante 10 minutos. Las muestras estarán listas para colocarlas en los carriles correspondientes del gel de acrilamida.

5. PASOS A SEGUIR PARA EL USO DEL EQUIPO DE ELECTROFORESIS,17.

1) Lavar el equipo de electroforesis con agua destilada.

2) Sobre una superficie lisa, armar el equipo "sandwich" de electroforesis, según las instrucciones de la compañía manufacturera. (Este equipo es en donde se prepara el gel de acrilamida).

3) Adicionar al "sandwich" la solución del gel separador y permitir que gelifique.

4) Adicionar al "sandwich" la solución del gel concentrador, colocar el peine (que formará los carriles) en la parte superior del sandwich, haciendo contacto con el gel, y permitir que gelifique.

5) Montar el "sandwich" (con los geles formados) en el equipo de electroforesis, adicionar buffer de corrimiento (i) en la cámara alta del equipo.

6) Colocar suavemente las muestras de enzima o proteína (digeridas o sin digerir) en los carriles correspondientes.

7) En la cámara inferior del equipo de electroforesis, verter buffer de corrimiento (i).

8) Colocar el ánodo y cátodo correspondientes y conectarlos a una fuente de poder.

9) Emplear el sistema de refrigeración, para evitar que el gel se rompa.

10) Al término del tiempo correspondiente, en el cual las proteínas "corrieron" en el gel desconectar la fuente de poder, desarmar el equipo y abrir con cuidado el "sandwich", de tal forma que el gel no se rompa.

11) Colocar el gel en la solución teñidora (k) durante 24 hrs., si es posible con agitación constante.(ver también tinción con nitrato de plata)

12) Al recipiente con el gel, cambiarle la solución teñidora por la solución desteñidora uno (l) de 4 a 6 hrs.

13) Sustituir la solución teñidora uno por la dos (m), dejar reposar durante 6 hrs. y guardar en refrigeración en agua destilada o desecar el gel

14) Colocar los geles en un recipiente de vidrio con la solución desecadora de glicerol (n), recortar 2 rectángulos (ligeramente mayores al tamaño del gel) de celofán dulce y colocarlos en la misma solución, dejar reposar los geles y el celofán durante 12 horas. Sobre un vidrio liso y seco colocar un rectángulo de celofán, sobre el colocar el gel y de nuevo otro pedazo de celofán, sujetar con maskin-tape y dejar deshidratar durante 48 horas.

6.- TINCIÓN DE GELES DE ELECTROFORESIS CON NITRATO DE PLATA.

REACTIVOS:

- 1) Solución fijadora de proteínas: Metanol al 50% v/v + Ácido acético al 10%
- 2) 100 ml de Hidróxido de Sodio (NaOH) 0.1M + 20 ml de Hidróxido de Amonio (NH_4OH) en agitación constante.
- 3) Diluir 4g de Nitrato de Plata (AgNO_3) disueltos en 20 ml de Agua desionizada fría.
- 4) Solución teñidora de plata: Adicionar a la solución de Hidróxido de Sodio e Hidróxido de Amonio la solución de Nitrato de Plata lentamente y con agitación constante, también se adiciona 300 ml de agua desionizada fría (NOTA: Al término de mezclar ambas soluciones debe quedar una solución transparente; si se forman precipitados color pardo o marrón adicionar más cantidad de Hidróxido de Amonio hasta que dicha precipitación se elimine).
- 5) Solución reveladora: Disolver 50 mg de ácido cítrico en 500 ml de agua desionizada, adicionar 1 ml de formaldehído y aforar a un litro.
- 6) Solución catalizadora, para controlar la reacción. Hacer una mezcla de Isopropanol al 25% con ácido acético al 7%.

NOTA: Estas cantidades y tiempos están sujetos a "prueba y error", según el método y concentración empleada en la elaboración de los geles de electroforesis.

PROCEDIMIENTO

- 1.- Después de separar el gel del equipo de electroforesis (Ver 5.10) colocar el gel en la solución fijadora de proteínas (6.1) durante una hora. Eliminar la solución fijadora y realizar tres lavados con agua desionizada cada uno de 10 minutos.
- 2.- Al gel previamente "lavado" se le adiciona la solución teñidora de plata (6.4) y dejar en agitación durante 20 minutos aproximadamente.
- 3.- Tirar la solución teñidora de plata y realizar cuatro lavados con 500 ml de agua desionizada durante 10 minutos cada uno.
- 4.- Adicionar al gel la solución reveladora (6.5) y agitar hasta que las bandas de proteína se observen claramente, para impedir que la reacción continúe agregar la solución catalizadora (6.6).
- 5.- Desecar el gel como se indica en la sección 5.14 (de este anexo).

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- ALAIS, CH. (1984). *La Cioncia de la Locho*. CECSA. México.
- 2.- ALEXOPOULOS, C.J. (1985). *Introducción a la Micología*. Omega. España.
- 3.- ALHIR, S. et al. (1990). "Lipase of *Penicillium caseicola*". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. V.38. USA. 598-601.
- 4.- BADUI, S. (1988). *Diccionario de Tecnología de los Alimentos*. Alhambra. México.
- 5.- BOHINSKI, R. (1991). *Bioquímica*. Addison Wesley Iberoamericana. USA.
- 6.- BOYSEN, M. et al. (1996). "Reclassification of the *Penicillium roqueforti* Group into Three Species on the Basis of Molecular Genetic and Biochemical Profiles". *Microbiology*. V.142. USA. 541-549.
- 7.- CENZANO I. (1992). *Los Quesos AMV*. España.
- 8.- CHEFTAL, J. (1980). *Introducción a la Bioquímica y Tecnología de los Alimentos*: Vol. 1 Acmbia. España.
- 9.- *DIARIO OFICIAL DE MÉXICO*. 18 DE DICIEMBRE DE 1980. (Artículos: 345, 346, 348, 349, 351, 352, 353, 354, 358, 363). Publicación del Gobierno Mexicano.
- 10.- GEANKOPLIS, CH. (1982). *Procesos de Transporte y Operaciones Unitarias*. C.E.C.S.A. México.
- 11.- GERHARTZ, W. (1990). *Enzymes in Industry Production and Applications*. VCH. Germany.
- 12.- HAROLD E. (1991). *Análisis Químico de los Alimentos de Pearson*. CECSA. México.
- 13.- HUANG, H.T. (1976). "Enhancement of Cheese Flavors with Microbial Esterases". *Biotechnology and Bioengineering*. V.18 USA. 909-919.
- 14.- KINSELLA, J. et al. (1986). "Biosynthesis of Flavors by *Penicillium roqueforti*". *Biotechnology and Bioengineering*. V.18. USA. 927-938.
- 15.- KOSIKOWSKI, F. (1978). *Cheese and Fermented Milk Food*. Edwards Brother's. USA.
- 16.- MADRID, A. (1994). *Nuevo Manual de Tecnología quesera*. AMV. España.

- 17.- *Manual de Operación de Equipo de electroforesis Protean II xi Cell y Protean II xi 2-D Cell*. (1990). Bio Rad. U.S.A.
- 18.- MOSKOWITZ, G. et al. (1987). "Enzyme-Modified Cheese Technology". *Journal of Dairy Science*. **70** (8) USA. 1761-1769.
- 19.- NURKO, A. (1990) "Determinación de las condiciones de modificación de queso fresco y semimadurado con el sistema enzimático con actividad lipolítica de *Penicillium roqueforti*". Tesis. Universidad Iberoamericana. México.
- 20.- QUINTERO R. y LOPEZ A. (1987). *Tecnología Enzimática. Aplicación en Alimentos y Medicina*. UNAM. México.
- 21.- RICKWOOD, D. & HAMES B. (1987). *Gel Electrophoresis of Proteins: a Practical Approach*. IRL Press. USA.
- 22.- SCOTT, R. (1991). *Fabricación de Queso*. Acribia. España
- 23.- SMITH, G. (1973) *Introducción a la Micología Industrial*. Acribia. España.
- 24.- SPREER, CH. (1978). *Lactología Industrial*. Acribia. España.
- 25.- STEPANIAL, L. et al. (1980). "Lipolytic and Proteolytic Activity of *Penicillium roqueforti*, *P. Candidum* and *P. Camemberti* strains". *Acta Alimentaria Polonica*. **6**(3). Polonia. 30-31.
- 26.- TAMIO, M. et al (1994) "Purification and Characterization of *Penicillium roqueforti* IAM 7268 Lipase". *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. **59**(2). USA. 329-330.
- 27.- TREVAN, P. (1990). *Biología: Los Principios Biológicos*". Acribia. España.
- 28.- TSUNEO, Y. (1987). "Enzyme Technology for the Lipids Industry: An Engineering Overview". *Journal of the American Oil Chemist's Society*. **64**(12). USA. 1657-1662.
- 29.- VEISSEYRE, R. (1980). *Lactología Técnica*. Acribia. España.
- 30.- WISEMAN, A. (1991). *Manual de Biotecnología de las Enzimas*. Acribia. España.