



**UNIVERSIDAD DEL AZUAY**

**FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA**

**ESCUELA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS**

**AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE CEPAS DE  
*PENICILLIUM* APLICABLES EN PROCESOS  
BIOTECNOLÓGICOS DE LÁCTEOS**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO  
DE INGENIERA EN ALIMENTOS.**

**AUTOR:**

**JANETH MARINA ZHIMINAICELA SÁNCHEZ**

**DIRECTOR:**

**ING. CLAUDIO SÁNCHEZ JÁUREGUI.**

**CUENCA – ECUADOR**

**2008**

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo de tesis a Dios por regalarme un día más de vida y por haberme concedido la bendición de tener unos padres maravillosos.

También dedico este trabajo a mis papas Félix Benjamín y María Dolores quienes siempre han estado velando por mi bienestar y me han apoyado en toda mi vida estudiantil; porque sin su ayuda económica y moral hoy no estaría culminando esta difícil pero valiosa etapa de mi vida universitaria.

**Janeth Marina.**

## AGRADECIMIENTO

Expreso mis más sinceros agradecimientos a:

- ❖ Claudio Sánchez, Ingeniero en alimentos, Director de la presente tesis por tener la disponibilidad de su valioso tiempo para dirigirme en la elaboración de esta tesis. De la misma manera agradezco a la Dr. María Elena Cazar, al Dr. Piercósimo Tripaldi, y a la Ingeniera María Fernanda Rosales quienes siempre estuvieron dispuestas a ayudarme en todo el transcurso de tiempo que duro la elaboración de esta tesis.
- ❖ A mi abuelito Alejandro quien siempre me supo dar sus sabios consejos para que siga adelante en mis estudios; a mis hermanos Santiago, Verónica, Diego, Jessica Adriana; quienes siempre han confiado en mí, y a una persona muy especial en mi vida Jorge Armando quien siempre me ha dado su apoyo incondicional en los buenos y malos momentos.
- ❖ Finalmente, agradezco a mis queridos Padres Félix Benjamín y María Dolores por brindarme la oportunidad de nacer y siempre inculcarme buenos valores especialmente el de la responsabilidad con la cual pude salir adelante.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>CONTENIDOS</b>	<b>PÁGINA</b>
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTO.....	iii
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	iv
ÍNDICE DE CUADROS Y GRÁFICOS.....	vii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	x
INTRODUCCIÓN.....	1
<b>CAPITULO I: QUESO DE PASTA</b>	
1.1 HISTORIA Y GENERALIDADES.....	3
1.1.1 Historia.....	3
1.1.2 Generalidades.....	4
1.2 CARACTERÍSTICAS SENSORIALES, FÍSICO-QUÍMICOS Y MICROBIOLÓGICAS.....	5
1.2.1 Características sensoriales.....	5
1.2.2 Forma y peso.....	5
1.2.3 Características físico-químicas.....	6
1.2.4 Composición del queso de pasta azul.....	6
1.2.5 Características microbiológicas.....	6
1.3 TIPOS DE <i>PENICILLIUM</i> QUE SE USAN EN QUESERÍA.....	7
1.3.1 Empleo del <i>Penicillium roquefortii</i> .....	8
1.3.2 Función que cumple el <i>Penicillium</i> en quesería.....	9
1.3.3 Características del <i>Penicillium</i> .....	9
1.3.4 Características de las cepas que se emplean en la elaboración del queso.....	9

1.4 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL <i>PENICILLIUM</i> .....	10
1.5 CONSUMO DEL QUESO DE PASTA AZUL.....	10

## **CAPITULO II: OBTENCIÓN DEL *PENICILLIUM* DE QUESOS DE PASTA AZUL**

2.1 MATERIALES Y MÉTODOS UTILIZADOS PARA LA OBTENCIÓN DEL <i>PENICILLIUM</i> .....	13
2.1.2 Materiales.....	13
2.1.3 Medios de cultivos.....	14
2.1.4 Métodos utilizados para la obtención del <i>Penicillium sp</i> .....	15
2.1.5 Microcultivos de <i>Penicillium sp</i> .....	15
2.1.6 Técnica.....	15
2.2 OBTENCIÓN, PURIFICACIÓN Y MANTENIMIENTO DEL AISLADO FUNGAL.....	16
2.2.1 Obtención del <i>Penicillium sp</i> .....	16
2.2.2 Preparación de los cultivos.....	17
2.2.3 Purificación de las cepas de <i>Penicillium sp</i> .....	18
2.2.4 Mantenimiento del aislado fungal.....	18

## **CAPITULO III: ELABORACIÓN Y CONDICIONES DE MADURACIÓN DEL QUESO DE PASTA AZUL**

3.1 PROCESO TECNOLÓGICO DEL QUESO DE PASTA AZUL.....	20
3.1.1 Descripción del proceso tecnológico.....	24
3.2 AMBIENTE PARA LA AFINACIÓN DE LA MADURACIÓN DE LOS QUESOS DE PASTA AZUL.....	26
3.2.1 Agentes de la maduración de los quesos.....	26
3.3 FACTORES QUE INCIDEN EN LA MADURACIÓN.....	27
3.3.1 La actividad del agua $A_w$ .....	27
3.3.2 La temperatura.....	28
3.3.3 Tiempo.....	28

3.3.4 Aireación y composición de la atmósfera.....	28
3.4 CÁMARA DE MADURACIÓN.....	29
3.5 PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS DEL QUESO.....	29
3.6 EVALUACIÓN SENSORIAL DEL QUESO DE PASTA AZUL.....	30

#### **CAPITLO IV: RESULTADOS**

4.1 ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DEL QUESO DE PASTA AZUL.....	34
4.2 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL QUESO DE PASTA AZUL.....	34
4.2.1 Prueba de tipificación del queso azul.....	34
4.2.2 Observación del desarrollo en el agar Malta.....	35
4.2.3 Resultados de las pruebas microbiológicas del queso.....	35
4.3 RESULTADOS EVALUACIÓN SENSORIAL DEL QUESO DE PASTA AZUL.....	36
4.4 PROPUESTAS DE DEGUSTACIÓN DEL QUESO DE PASTA AZUL.....	40
4.5 CONDICIONES DE EMPAQUE PARA EL QUESO DE PASTA AZUL.....	40
4.6 ETIQUETADO Y ROTULACIÓN DEL QUESO DE PASTA AZUL...	41
4.6.1 Denominación del alimento.....	42
4.6.2 Declaración del contenido de grasa de la leche.....	42
4.6.3 Marcado de la fecha.....	43
4.6.4 Etiquetado de envases no destinados a la venta por mayor.....	43
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>45</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>47</b>

## INDICE DE CUADROS Y GRÁFICOS

CUADRO 1: COMPOSICIÓN DEL QUESO AZUL POR CADA 100 GR...	6
CUADRO 2: REQUISITOS MICROBIOLÓGICOS.....	7
CUADRO 3: PRODUCCIÓN DE QUESOS SEMIDUROS EN ARGENTINA.....	11
CUADRO 4: RESULTADO DE LOS ANÁLISIS QUÍMICOS.....	34
CUADRO 5: RESULTADO DE LOS ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS....	35
CUADRO 6: DENOMINACIÓN DEL QUESO SEGÚN SUS CARACTERÍSTICAS DE CONSISTENCIA Y MADURACIÓN	42
CUADRO 7: PORCENTAJE DE GRASA DE LA LECHE.....	43
GRÁFICO 1: RESULTADOS DE EVALUACIÓN DEL COLOR.....	36
GRÁFICO 2: RESULTADOS DE EVALUACIÓN DE LA TEXTURA.....	37
GRÁFICO 3: RESULTADOS DE EVALUACIÓN DE LA IMPRESIÓN GLOBAL.....	37
GRÁFICO 4: RESULTADOS DE EVALUACIÓN DEL AROMA.....	38
GRÁFICO 5: RESULTADOS DE EVALUACIÓN DEL SABOR.....	38
GRÁFICO 6: RESULTADOS DE EVALUACIÓN DE LAS SENSACIONES TRIGEMINALES.....	39
GRÁFICO 7: RESULTADOS DE EVALUACIÓN DE ACEPTACIÓN DEL QUESO.....	39

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: FORMATO DE LA PRUEBA DE DEGUSTACIÓN.....	51
ANEXO 2: DIAGRAMA DE PROCESO DEL QUESO DE PASTA AZUL.....	53
ANEXO 3: FOTOGRAFÍAS DE LOS MATERIALES USADOS EN LA INVESTIGACIÓN.....	54
ANEXO 4: MATERIALES USADOS PARA EL AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL <i>PENICILLIUM</i> .....	55
ANEXO 5: DESARROLLO DEL <i>PENICILLIUM ROQUEFORTII</i> .....	56
ANEXO 6: TIPIFICACIÓN DEL <i>PENICILLIUM ROQUEFORTII</i> .....	60
ANEXO 7: MATERIALES USADOS PARA ELABORAR LA CÁMARA DE MADURACIÓN PARA EL QUESO.....	61
ANEXO 8: PROCESO DE ELABORACIÓN DEL QUESO Y DESARROLLO DE L <i>PENICILLIUM</i> EN EL QUESO.....	62

## RESUMEN

Por medio de procesos biotecnológicos se elaboró el queso de pasta azul inoculando a seis litros de leche 1 ml de esporas diluidas de *Penicillium roquefortii*. Dichas esporas fueron aisladas y purificadas de un queso comercial. Posteriormente el queso se lo colocó en una cámara de maduración a condiciones de humedad y temperatura de 87% a 90%; y de 18°C a 20°C, respectivamente. El producto obtenido fue evaluado en sus características sensoriales por un panel no entrenado. Los resultados obtenidos nos permitieron establecer las condiciones de crecimiento de una cepa de *P. roquefortii* adecuada para la preparación de queso azul a escala de laboratorio.

## **ABSTRACT**

By means of biotechnological processes, blue cheese was elaborated inoculating 1 ml of diluted spores from *Penicillium roquefortii* in six liters of milk. The spores were isolated and purified from a cheese obtained in local markets. Afterwards, the product was placed in a maturing chamber at moisture and temperature conditions (from 87% to 90% and from 18°C to 20°C). The final product was evaluated by sensorial analysis for a not trained panel. The results of this work were the determination of the suitable media for the fungus development and the maturing conditions of the final products. Applying this condition is possible to obtain blue cheese at a lab scale.

Zhiminaicela Sánchez Janeth Marina

Trabajo de graduación

Ing. Claudio Sánchez Jáuregui

Julio del 2008

## **AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE CEPAS DE *PENICILLIUM* APLICABLES EN PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS DE LACTEOS.**

### **INTRODUCCIÓN**

La aplicación de técnicas de aislamiento y purificación de cepas de *Penicillium* aplicables y su utilización en procesos biotecnológicos de lácteos es un tema de suma importancia ya que nos permite obtener diversos productos lácteos, que pueden llegar a un espectro mayor de consumidores. Además, los productos elaborados con herramientas biotecnológicas permiten obtener resultados favorables desde el punto de vista de calidad y costos. El desarrollo alcanzado en las técnicas de aislamiento e identificación de aromas, colorantes y sabores, hacen que el área de productos naturales sea la de mayor crecimiento dentro del campo de la química orgánica mediante el uso de la biotecnología y bioingeniería. Los microorganismos constituyen una de las fuentes menos estudiadas y más promisorias en la transformación biotecnológica, ofreciendo grandes posibilidades para la obtención de nuevas estructuras y actividades biológicas.

La presencia de hongos en alimentos de consumo humano tiene una enorme importancia biotecnológica debido a que éstos son utilizados como iniciadores microbiológicos en la maduración de distintos productos con el fin de obtener determinadas características sávido aromáticas deseables para el producto final. La investigación de este proyecto se baso en los siguientes objetivos:

## **OBJETIVO GENERAL**

- ❖ Desarrollar una metodología para el aislamiento y purificación de cepas de *Penicillium* y su aplicación en procesos biotecnológicos de lácteos.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- ❖ Aislar y purificar el *Penicillium* para la elaboración del queso de pasta azul a partir de un sustrato comercial.
- ❖ Crear las condiciones adecuadas de maduración para el queso que se pretende elaborar.
- ❖ Elaborar un queso de pasta azul a partir del *Penicillium* que se aísle, realizando varias pruebas experimentales hasta obtener el queso deseado.
- ❖ Realizar una evaluación sensorial al queso obtenido.

Estas propuestas se llevo a cabo cultivando y aislando el microorganismo (*Penicillium*) de sustratos comerciales (quesos), para ser utilizado en la producción de quesos de pasta azul, mediante el uso de procesos biotecnológicos, este queso se elaboró inoculando el hongo en la leche de vaca pasteurizada y de esta forma se obtuvo un producto similar al que se expenden en el mercado.

Posteriormente se realizó una evaluación sensorial para saber el grado de satisfacción de los posibles consumidores, para esto se utilizó un panel de degustación no entrenado y de esta forma se determinó que el queso de esta investigación tiene una buena aceptación, puesto que sus características sensoriales son similares a la del queso azul comercial.

## CAPITULO I

### QUESOS DE PASTA AZUL

#### 1.1 HISTORIA Y GENERALIDADES

##### 1.1.1 HISTORIA

La leyenda que rodea a este queso de pasta azul está protagonizada por un joven pastorcillo que olvidó su requesón y un pedazo de pan de centeno en el interior de la cueva que le servía de cobijo, cuando regreso después de algún tiempo observó que el requesón de oveja mostraba un vetado color verde suave y el pan estaba cubierto de un fino moho. Como el pastorcillo estaba hambriento poco escrupuloso se lo comió, descubriendo así el milagro del queso Roquefort. (Martegani, 2007).

Tres son los motivos de que el queso de pasta azul sea uno de los más cotizados en el mercado: el primero, la leche de 4 diferentes razas de ovejas criadas sólo para la producción del queso, (la Lacune, Lorzac, Segola y Causses); el segundo, el proceso de análisis que los científicos llevan a cabo para lograr los puntos deseados de añejamiento y la utilización de las bacterias responsables del sabor; y tercero, las condiciones ambientales de las cuevas de Causse de Cambalou, que la ciencia no ha podido igualar. (Martegani, 2007).

En la fabricación del queso Roquefort intervienen una serie de reacciones químico-biológicas. El ingrediente principal, después de las cuatro leches de ovejas, es una bacteria conocida como *Penicillium roquefortii*, la cual es esparcida cuidadosamente sobre el cuajo, quedando preparado para ser llevado a las grutas donde madurará lentamente. (Martegani, 2007).

El fenómeno Roquefort arranca en la era jurásica, hace unos 200 millones de años, con el hundimiento de la montaña Combalou. Esta convulsión de la naturaleza crea un entorno geológico único para lo que más tarde sería el queso Roquefort. Se forma entonces el actual macizo rocoso con las cuevas naturales que influyen en la curación del queso Roquefort y que lo han convertido en un símbolo gastronómico en todo el mundo. (Martegani, 2007).

### **1.1.2 GENERALIDADES**

Estos quesos se distinguen por la presencia de mohos, los cuales les dan sus colores verdes o azulados. Quizá sea la variedad que más rechazo pueda causar a simple vista, debido al color y al fuerte olor, que puede recordar al de la descomposición. Sin embargo, su intenso sabor es uno de los más apreciados por los *gourmets* del queso.

Para conseguir la proliferación de los mohos hay que almacenar los quesos en lugares con humedades muy elevadas, normalmente 90% HR. Los mohos que proliferan en los quesos normalmente son del género *Penicillium*, en el que varias de sus especies reciben el nombre del queso en el que se encuentran, como el *Penicillium camemberti* (en la corteza del camembert), o el *Penicillium roquefortii*, del queso roquefort.

Otros quesos famosos por sus mohos son el queso de Cabrales asturiano, el queso stilton procedente de Inglaterra, o el queso gorgonzola italiano, que puede encontrarse en una variedad dulce (aunque ligeramente picante), y en otra variedad de sabor mucho más fuerte y picante.

## 1.2 CARACTERÍSTICAS SENSORIALES, FÍSICO-QUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS.

### 1.2.1 Características sensoriales

El queso de pasta azul se distingue por poseer las siguientes características:

- ❖ **Sabor:** Picante, salado, característico.
- ❖ **Aroma:** Intenso propio de este tipo de queso
- ❖ **Color:** Blanco a blanco amarillento, uniforme, con vetas características de color verde, verde azulado o verde grisáceo.
- ❖ **Corteza:** Puede presentar untuosidad superficial de color ligeramente parduzco, rugosa, débil, sin rajaduras, y compacta.
- ❖ **Consistencia:** Es semidura desmenuzable o semiblanda pastosa.
- ❖ **Textura:** Textura abierta, con desarrollo de mohos distribuidos de manera razonablemente uniforme, con vetas características de color verde, verde azulado o verde grisáceo. (Codex Alimentario Argentino).

### 1.2.2 Forma y peso

La forma y peso del queso al término de su maduración son las siguientes:

- ❖ **Altura máxima:** 10 cm.
- ❖ **Diámetro máximo:** 20 cm.
- ❖ **Peso mínimo:** 2 Kg.
- ❖ **Peso máximo:** 13 Kg. (Rango permitido de Hormas: 2 a 13 Kg)
- ❖ **Forma:** Es cilíndrica, con caras sensiblemente planas. (Guillen, 1990).

### 1.2.3 Características físico – químicas

El queso azul responde a las características de composición y calidad de los quesos de mediana o alta humedad y grasos o semigrasos, dichas características están descritas en el código alimentario argentino artículo 608 para la materia grasa y en el artículo 609 para determinar la humedad del queso y establece lo siguiente:

- ❖ Materia grasa del extracto seco entre 45,0 y 59,9%.
- ❖ Materia grasa del extracto seco entre 25 y 39,9%.
- ❖ Humedad entre 36,0 y 45,9% para los conocidos como quesos de pasta semidura
- ❖ Humedad entre 46,0 y 54,9% para los conocidos como quesos de pasta semiblanda.

### 1.2.4 Composición del queso de pasta azul

El queso azul contiene, proteínas, grasas y minerales que se describen a continuación:

CUADRO 1: COMPOSICIÓN DEL QUESO AZUL POR CADA 100GR

Proteínas (g):19,2	Fósforo (mg):250
Grasas (g):38.8	Tiamina (mg):0.239
Cenizas (g):4.40	Riboflavina (mg):0.404
Sodio (mg):1210	Energía (Kcal):426
Potasio (mg):74	
Calcio (mg):200	

Fuente: Martegani 2007

### 1.2.5 Características microbiológicas

Los requisitos microbiológicos definidos en esta norma, han sido establecidos conforme a los criterios y planes de muestreo para aceptación de lotes de la Comisión

Internacional de especificaciones Microbiológicas de los Alimentos (ICMSF). Los métodos analíticos responden a la metodología internacionalmente aceptada.

Los requisitos microbiológicos para el queso azul están establecidos en el Reglamento Técnico del Mercosur de identidad y calidad de los quesos y estos han sido incorporados al código alimentario argentino.

CUADRO 2: REQUISITOS MICROBIOLÓGICOS PARA EL QUESO AZUL

Microorganismos	Criterios de aceptación	Categoría ICMSF	Método de Ensayo
Coliformes/ g (30 C)	n = 5 c = 2 m = 5000 M = 10000	5	FIL 73A: 1985
Coliformes/ g (45 C)	n = 5 c = 2 m = 100 M = 1000	5	ALPHA 1992,C.24 (1)
Estafilococos coag. Pos./g	n = 5 c = 2 m = 1000 M = 5000	5	FIL 145: 1990
Salmonella spp/25g	n = 5 c = 0 m = 0	10	FIL 93A: 1985
Listeria monocytogenes/25g	n = 5 c = 2 m = 0	10	FILL 143: 1990

Fuente: Codex alimentario, 2007.

**n:** número de unidades de muestra analizada.

**c:** número máximo de unidades de muestra cuyos resultados pueden estar comprendidos entre m (calidad aceptable) y m (calidad aceptable provisionalmente).

**m:** nivel máximo del microorganismo en el alimento, para una calidad aceptable.

**M:** nivel máximo del microorganismo en el alimento, para una calidad aceptable provisionalmente.

### 1.3 TIPOS DE *PENICILLIUM* QUE SE USAN EN QUESERÍA

El género *Penicillium* es un hongo que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y es productor de ácidos orgánicos como el ácido cítrico, el ácido fumárico, el ácido oxálico, el ácido glucónico y el ácido gálico. Posee colonias de color verde y

aspecto verdoso que son inodoras. Los conidióforos son de pared netamente rugosa y las hifas de pared fina. Las principales especies de mohos utilizados en la elaboración de quesos que pertenecen a esta familia y son:

- ❖ *Penicillium roquefortii*
- ❖ *Penicillium glaucum*
- ❖ *Penicillium gorgonzola*
- ❖ *Penicillium candidum*
- ❖ *Penicillium camemberti*

Los tres primeros son utilizados para la elaboración de quesos de pasta azul, y los dos últimos para la elaboración de quesos de pasta blanda.

Los mohos utilizados para la elaboración de quesos de pasta azul se suelen añadir a la leche o al queso. Estos mohos, para su crecimiento, necesitan gran cantidad de oxígeno, de manera que se suelen perforar los quesos con agujas para que entre el aire. Se les deja respirar durante el proceso de maduración y los mohos se van desarrollando desde el interior hacia la superficie del queso. Al cabo de unas cuatro o cinco semanas de maduración ya se ven los mohos azules sobre la parte exterior de los quesos. (Martegani, 2007).

### **1.3.1 Empleo del *Penicillium roquefortii***

El *Penicillium roquefortii* se emplea para la elaboración de quesos por su acción lipolítica y proteolítica poderosa, responsable del aroma típico del queso Roquefort o del queso de cabrales. El aroma se debe sobre todo a las metilcetonas y los alcoholes secundarios que produce, así como los aminoácidos y el amoníaco liberado por las distintas reacciones químicas. (Carpenter, 1979).

### **1.3.2 Función que cumple el *Penicillium* en quesería**

Dentro de las funciones que cumple el *Penicillium* en quesería citamos las siguientes:

- ❖ Provoca la desacidificación de la pasta del queso, mediante la utilización del ácido láctico.
- ❖ Segregan un conjunto de enzimas que le confiere un poder proteolítico importante.
- ❖ Desarrolla una gran actividad lipolítica, produciendo el aroma típico de los quesos de pasta azul. (Maulini, 2007).

### **1.3.3 Características del *Penicillium***

Para poder emplear el *Penicillium* en la quesería debe cumplir con las siguientes características:

- ❖ Las cepas que van a ser usadas para elaborar el queso tienen que ser capaces de crecer y desarrollarse en las condiciones que este el alimento.
- ❖ Las cepas deben estar libres de microorganismos patógenos.
- ❖ Además las cepas no deben producir sustancias que afecten a otros microorganismos o al desarrollo normal del proceso fermentador. (Maulini,2007).

### **1.3.4 Características de las cepas que se emplean en la elaboración del queso**

Los fermentos fúngicos están constituidos por una cepa pura o por una asociación de cepas seleccionadas de mohos. Se pueden aislar de elaboraciones tradicionales o bien de colecciones de laboratorio. Las cepas a emplear se eligen según los siguientes criterios:

- ❖ La cepa que va a ser usada en el proceso de elaboración del queso tienen que ser de fácil empleo.
- ❖ La cepa debe ser lo más robusta posible, para que se efectúe su desarrollo en el queso.
- ❖ La cepa debe estar desprovista de poder patógeno, para evitar intoxicaciones en el consumidor. (Martegani, 2007).

#### **1.4 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL *PENICILLIUM***

El *Penicillium* es un hongo que inhibe el desarrollo de diversos microorganismos que pueden afectar la salud de los seres humanos, pues fue a partir de este hongo que se descubrió la penicilina y es muy utilizado en la industria farmacéutica ya que es activo sobre el estafilococo, estreptococo y neumococo, así como sobre la mayor parte de los microorganismos gram positivos, presentando escasa acción sobre los gram negativos.

El hongo del que Fleming aisló la penicilina se identificó como *Penicillium notatum*, más tarde se encontró que otras especies proporcionaban cantidades mayores del antibiótico, y en la actualidad se emplea una cepa distinta, denominada *Penicillium chrysogenum*, la cual es utilizada para la producción comercial de la penicilina (Carpenter, 1979).

En el presente trabajo, la cepa aislada de *Penicillium* se utilizó para la elaboración de quesos de pasta azul, este hongo no segrega sustancias inhibitoras del crecimiento de otros microorganismos, pero como se indicó en el punto 1.3.1 de este capítulo sintetizan sustancias que ayudan con el aroma y sabor de los quesos.

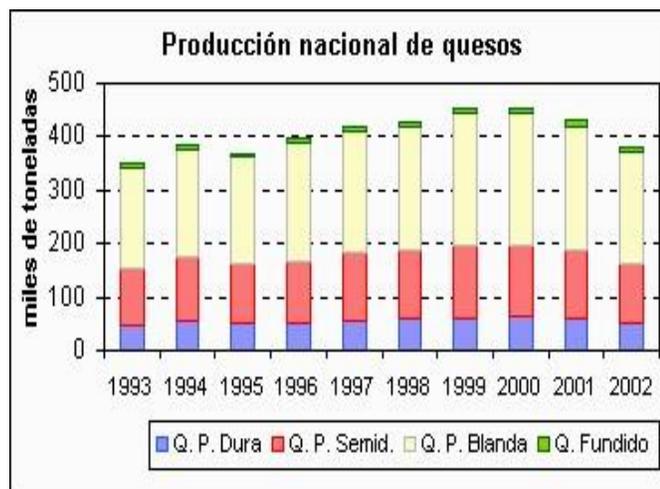
#### **1.5 CONSUMO DEL QUESO DE PASTA AZUL**

El queso de pasta azul es muy consumido por toda Europa especialmente en los países de Francia e Italia, ya que los habitantes de estos países gustan de este queso, por su sabor intenso, mantecoso y fundente al paladar; la principal característica de este queso es que se puede degustar como aperitivo o después de las comidas y antes del postre.

El queso azul es considerado por los Italianos como queso de mesa, puesto que se lo usa mucho en la cocina para prepara una gran variedad de platillos que son de su agrado. En ocasiones, gustan de amasar este queso con una pequeña proporción de sidra, mezclándolo en la misma mesa como un rito, de manera que se forma una pasta untuosa fácilmente distribuible sobre trozos de pan, lo que al mismo tiempo suaviza su sabor.

Debido a que en Ecuador no existe un dato estadístico a cerca del consumo de este tipo de quesos se hace una breve reseña del consumo de este producto; en otro país como es Argentina, debido a que es uno de los países dentro de América del Sur que se consume y se lo produce mayoritariamente, pues a pesar de que el originario Queso Roquefort francés se elaboraba con leche cruda de oveja, en Argentina se utiliza la leche pasteurizada de vaca con la cual los argentinos manufacturan el Queso Azul .Este queso fue introducido en este país por los inmigrantes venidos de Europa, quienes conservaron el tradicional proceso de elaboración de este producto. La producción de quesos de pasta semidura en este país abarca un 30%.

CUADRO 3: PRODUCCIÓN DE QUESOS SEMIDUROS EN ARGENTINA



Fuente: Shaller, 2007

Cabe mencionar que la producción de quesos de pasta semidura o más conocida como quesos azules se consume internamente y también se exporta así tenemos que para el

año 2003 Argentina exportó más de 190.000 Kg de queso Azul (el 50 por ciento al Mercosur), lo cual es muy beneficioso para la economía Argentina.

En cuanto a nuestro país el queso de pasta azul es un producto que no se produce a grandes escalas, debido a que poca gente lo conoce y lo consume.

En la Ciudad de Cuenca se revisaron los diferentes mercados donde se expende alimentos tipo Gourmet como Supermaxi, Coralcentro y el Delicatessen El Español y lo que mayoritariamente se expende en estos lugares es el queso Camemberti, Brie, Gorgonzola y en menor cantidad el Queso Roquefort, estos dos últimos se consiguen en El español; este Delicatessen vende el queso azul (Gorgonzola) de la marca norteamericana, Danish Blue a 22,80 dólares el kilo de queso. Los quesos que se expenden en el Supermaxi y Coralcentro son elaborados con Penicillium, y se los manufactura en empresas ecuatorianas como: FLORALP y EQF S.A. (El Queso Francés S.A.) de la ciudad de Tulcán, que además poseen la marca francesa Président. Estos quesos se expenden a un costo de 1.15 a 1.68 dólares por cada 100 a 125 gr. de peso. El consumo de estos quesos de lo investigado en la ciudad de Cuenca, es de aproximadamente 8 kilos por mes, y es especialmente consumido por extranjeros y personas que han vivido en los países Europeos.

## **CAPÍTULO II**

### **OBTENCIÓN DEL *PENICILLIUM* DE QUESOS DE PASTA AZUL**

#### **2.1 MATERIALES Y MÉTODOS UTILIZADOS PARA LA OBTENCIÓN DEL *PENICILLIUM***

##### **2.1.2 Materiales**

Los materiales utilizados para aislar el *Penicillium sp.* a partir del sustrato comercial (queso azul) se listan a continuación:

- ❖ Cajas petri
- ❖ Hojas de bisturí
- ❖ Mangos de bisturí
- ❖ Guantes
- ❖ Parafilm
- ❖ Papel absorbente
- ❖ Tijeras
- ❖ Marcador
- ❖ Cámara de flujo laminar

Previo al trabajo experimental, la cámara de flujo laminar se desinfectó con alcohol potable y se irradió el interior con rayos UV por quince minutos. Los materiales utilizados se pueden apreciar en el anexo 4.

### 2.1.3 Medios de cultivos:

Los medios de cultivo utilizados para el desarrollo del *Penicillium sp.*, fueron:

❖ Agar Extracto de levadura, Malta y Glucosa (YMG)

<b>Componente</b>	<b>g/L</b>
Extracto de malta	10g
Glucosa	10g
Extracto de levadura	4g
Agar – Agar	15,625
Agua destilada	1L

❖ Agar Papa Dextrosa (PDA)

<b>Componente</b>	<b>g/L</b>
Puré de papa	20g
Glucosa	10g
Agar- Agar	15,625
Agua destilada	1L

❖ Agar Sabouraud 4%

<b>Componente</b>	<b>g/L</b>
Agar Sabouraud 4%	65g
Agua destilada	1L

#### **2.1.4 Métodos utilizados para la obtención del *Penicillium sp.***

Para obtener el *Penicillium sp.*, se elaboraron cultivos adecuados para el desarrollo del hongo y para lo cual se preparó 3 tipos de medios de cultivo, los cuales permiten un mejor desarrollo del micelio entre estos tenemos: Agar PDA, Agar Sabouraud y Agar YMG. (Brevis y Padilla., 1996).

#### **2.1.5 Microcultivos de *Penicillium sp.***

Muchos hongos presentan estructuras frágiles que al ser tomadas o tocadas con los instrumentos micológicos (gancho, espátula y asa) se destruyen o caen, no siendo posible observarlas y que son de importancia taxonómica. Con el fin de evitar este problema, se han ideado técnicas simples como el microcultivo. (Brevis y Padilla., 1996)

#### **2.1.6 Técnica**

Los microcultivos se realizaron para verificar si el hongo que se está desarrollando en los cultivos es el *Penicillium sp.*, y para ello se realizan cámaras húmedas, las que luego se observaron en el microscopio.

Para crear los microcultivos se procedió según la técnica de la Cámara Húmeda descrita por el autor (Brevis y Padilla., 1996):

- ❖ Se depositó una gota de agar (PDA, Sabouraud o YMG) sobre un portaobjeto limpio.
- ❖ Se sembró el hongo en el centro y alrededor del medio de cultivo. Esta preparación fue cubierta con un portaobjetos.
- ❖ La preparación se colocó dentro de una caja petri estéril, con un papel filtro embebido de agua destilada, con el fin de cultivar el hongo en cámara húmeda. Esta cámara fue incubada a 26°C, verificando las condiciones de humedad periódicamente, por cuatro días.

Transcurrido el tiempo indicado se observó el crecimiento fungal en el microscopio. Al emplear esta técnica se pudo observar claramente la forma micelar y los conidióforos del *Penicillium* descritos por el autor. (Pitt *et al.*, 1997).

## **2.2 OBTENCIÓN, PURIFICACIÓN Y MANTENIMIENTO DEL AISLADO FUNGAL**

### **2.2.1 Obtención del *Penicillium sp***

El *Penicillium* es un moho que se desarrolla preferentemente a temperaturas entre 20-35°C (mesófilos), existiendo además hongos psicrófilos y termófilos. Crece más lentamente que las bacterias, necesitando 2 - 4 días en algunos levaduriformes y de 7 a quince días hasta 30 días en los filamentosos. Por ello, es necesario incorporar a los medios de cultivo de aislamiento primario, inhibidores bacterianos (antibióticos y/o quimioterápicos de amplio espectro), ya que las bacterias pueden sobre pasar el desarrollo de los hongos e inclusive eliminarlos. (Brevis y Padilla, 1996).

Se desarrolla mejor y más rápido a pH cercano a 4; tolera grandes variaciones de pH (3,5-10). Puede crecer con 5% de ácido láctico en el medio. (Philipl, 1979).

Tolera concentraciones de sal de 2-2,5%. Los pequeños contenidos estimulan la germinación de los conidios y su límite de tolerancia es >20%. Sin embargo depende de las cepas ya que con 6-8%, algunas se retrasan en cuanto otras se ven favorecidas. (Philipl, 1979).

Es un microorganismo microaerófilo, pues requiere de un 5% de oxígeno y se ve ligeramente estimulado por un aporte de CO<sub>2</sub>. (Philipl, 1979). En el anexo 5 se puede apreciar el desarrollo del *Penicillium*.

### 2.2.2 Preparación de los cultivos

Para obtener el *Penicillium* y elaborar el queso azul, el hongo fue aislado de un pequeño pedazo de queso azul comercial, para ser sembrado en los diferentes agares.

Se prepararon 200ml de cada medio de cultivo, razón por la cual cada componente se peso exactamente.

Una vez que se ha pesado cada elemento, se colocó en envases de vidrio (frascos schott) respectivamente, se etiqueta y se dosifica el agua destilada, homogenizamos completamente; luego esterilizamos los cultivos en el autoclave a una temperatura de 121°C y se mantiene a dicha temperatura por 15 minutos.

Transcurrido el tiempo de esterilización, se enfría y se coloca de una a dos gotas de nistatina para que evite el desarrollo de levaduras y se lleva a la cámara de flujo laminar.

Cuando todos los materiales están estériles, procedemos a trabajar, lo primero que hacemos es colocar el agar en las cajas petri y luego se etiqueta respectivamente, y esperamos a que coagule.

Tomamos el sustrato y con la ayuda de un bisturí procedemos a aislar el hongo el cual es sembrando en cada cultivo que se realizó, para este caso se sembraron cuatro cajas por cultivo, y luego se las sello con parafilm y finalmente se las coloca en la incubadora a una temperatura de 26°C, temperatura óptima para su desarrollo, y se espera ocho días para ver su crecimiento; cada tres días se observa el desarrollo del micelio, esto se realiza para evitar la proliferación de levaduras, bacterias u otros microorganismos indeseables.

### 2.2.3 Purificación de las cepas de *Penicillium sp*

La purificación del hongo consistió en limpiar el cultivo de todo microorganismo no deseable, que se desarrolle alrededor del hongo en estudio, y según esto se procedió a retirar o eliminar la parte que estaba contaminada para lo cual se uso un bisturí estéril y cuando estaba demasiado contaminado el cultivo se aislaba solo la parte que mejor creció y que estaba libre de microorganismos indeseables y se procedió a sembrar en cajas nuevas de agar, esto se realizó con la finalidad de que únicamente crezca el *Penicillium sp*.

### 2.2.4 Mantenimiento del aislado fungal

El aislado fungal se lo mantuvo en agar Sabouraud y en el agar YMG, pues estos cultivos son en los que mejor se desarrollo el *Penicillium sp*.

Una vez que el *Penicillium* creció sin ningún contaminante, se mantuvo en refrigeración, la mayor cantidad de cajas que sea posible, posteriormente se congeló las esporas recolectadas en agua estéril. El congelamiento de las cepas de *Penicillium sp*, se hizo escogiendo las cajas en la que el *Penicillium sp* creció en toda la superficie.

Los materiales utilizados para el congelamiento de las esporas fueron:

- ❖ 10 Puntas estériles de 1ml
- ❖ 1 Pipeta de 1000 µl
- ❖ 10 tubos Ependorff para microcentrifugación
- ❖ Gradilla para los tubos ependorff
- ❖ Frasco Schott
- ❖ Agua destilada
- ❖ Asa bacteriológica

Las puntas de 1ml y los tubos ependorff, se los envolvió en papel aluminio por separado; luego medimos 250ml de agua destilada y se colocó en el envase de vidrio y se etiquetó, posteriormente se esterilizó el agua y los materiales que estaban envueltos en papel aluminio, se enfrió y se sometió a luz UV por 15 minutos en la cámara de flujo laminar.

Concluido la esterilización del material de trabajo, se retiró el parafilm de las cajas que contenían el *Penicillium sp*, luego colocamos la punta estéril de 1ml en la pipeta de 1000  $\mu$ l, posteriormente tomamos 1ml de agua estéril con la pipeta mencionada anteriormente y se coloca en la caja que contiene el hongo y con la ayuda de una asa previamente desinfectada se trató de aislar la mayor cantidad de esporas, las mismas que se mezclaron con el agua estéril que se adicionó, y con la ayuda de una pipeta tomamos el agua mezclada con las esporas posteriormente se colocaron en los tubos ependorff, se tapo , etiquetó y finalmente se las congeló y estaban listas para ser inoculadas en el sustrato (leche) que se utilizó para hacer el queso azul.

## **CAPITULO III**

### **ELABORACIÓN Y CONDICIONES DE MADURACIÓN DEL QUESO DE PASTA AZUL**

#### **3.1 PROCESO TECNOLÓGICO DEL QUESO DE PASTA AZUL**

Para llevar a cabo el proceso tecnológico del queso azul debemos tener presente lo siguiente:

**1. Calidad de la leche para el queso:** Para producir quesos buenos se tiene que partir de leche de buena calidad, la leche no debe tener ninguna clase de olor ni sabor anormal y debe tener procedencia de animales sanos.

**2. Pasteurización de la leche para queso:** Bajo el punto de vista sanitario, higiénico y técnico, se hace necesario pasteurizar la leche destinada a la producción de queso, pues la pasteurización permite:

- ❖ Destruir el 100% de las bacterias patógenas y el 99% de las bacterias vanales.
- ❖ Permite destruir las bacterias del tipo E. coli, las levaduras y enzimas de la leche.
- ❖ Permite obtener productos de más larga conservación. (Álvarez., [199-]).

**3. Cultivos lácticos usados para el queso:** Los cultivos lácticos de uso universal son bacterias que fermentan la lactosa con producción de ácido láctico y generalmente se usan mezcladas con bacterias que fermentan el ácido cítrico y citratos, con producción de elementos de aroma. Estas bacterias productoras de aroma originan el ácido acético, CO<sub>2</sub>, diacetilo y acetoina que influyen en el gusto de los quesos. Los cultivos lácticos se utilizan con las siguientes finalidades:

- ❖ Establecer las bacterias del tipo necesario en el queso.
- ❖ Asegurar el desarrollo del ácido que promueva la acción del cuajo y la sinéresis (contracción coloidal).
- ❖ Mantener la fermentación láctica de la cuajada durante el tiempo necesario, y asegurar el pH del queso
- ❖ Mejorar el medio del queso para la acción seleccionada de los microorganismos y sus enzimas durante la maduración.

La cantidad de cultivo generalmente varía de 1-2% para quesos duros y semiduros, de 0.5-1% para quesos semiblandos, los cultivos se agregan a la leche con cierta anterioridad al cuajo. Este espacio de tiempo se llama premaduración y sirve para ambientar a los microorganismos a nuevas condiciones de temperatura, acidez, etc. Esta premaduración varía con el tipo de queso y la calidad de la leche. (Alvares, [199-]).

**4. Coagulación de la leche por adición del cuajo:** Este tipo de coagulación se usa para la fabricación de la mayor parte de quesos madurados, semiduros y duros, el cuajo es extraído del estómago de terneros y cabritos lactantes.

El principio activo del cuajo es la quimosina, que es una enzima proteolítica que desdobla las proteínas y tiene la propiedad de hidrolizar los enlaces péptidos de las proteínas.

El punto isoelectrónico de la quimosina pura está a pH de 5,4; pero el cuajo actúa perfectamente al pH normal de la leche que es de 6,6 a 6,9 la quimosina es rápidamente inactivada. (Alvares, [199-]).

La eficiencia máxima de coagulación se desarrolla a temperaturas de 40- 42°C, pero bajo 10°C y a más de 65°C el cuajo no actúa. Los límites normales de trabajo para la mayor parte de los quesos son de 28-35°C; de esta forma se obtiene una coagulación más lenta y una cuajada más suave, de acuerdo con el tipo de queso. Por regla general

los quesos blandos requieren una temperatura de coagulación más baja, mientras que los quesos duros necesitan temperaturas un poco más altas. (Alvares,[199-]).

**5. Corte y fraccionamiento de la cuajada:** El corte de la cuajada tiene por finalidad provocar y acelerar la salida del suero; la cuajada es cortada con una lira, la misma divide a la cuajada en pequeños cubos cuando es aplicada vertical y horizontalmente, facilitando la salida rápida del suero.

**6. Desuerado:** Cuando el grano presenta la consistencia y características apropiadas a cada tipo de queso, se interrumpe la agitación y se deja al grano bajar al fondo del recipiente que lo contiene, para en seguida empezar el desuerado.

La interpretación de los signos que marcan el momento en que se debe dar por terminado el trabajo del grano es de los momentos más delicados de la fabricación de quesos, por cuanto si se interrumpe el trabajo antes de que el grano adquiera la consistencia, humedad, y acidez apropiada, el queso quedara con demasiada humedad, muy blando, posiblemente con elevada acidez y con textura muy frías (frágil); en cambio si se tarda demasiado en empezar el desuerado el queso quedara seco y duro. (Alvares, [199-]).

**7. Moldeado y prensado:** El moldeado del queso tiene por finalidad dar al queso determinado formato y tamaño de acuerdo a sus características y de acuerdo a la tradición y exigencias del mercado. Al colocar la cuajada en los moldes, se revisten estos de tela o paño para facilitar la salida del suero y para formar la corteza.

El objetivo del prensado es separar más suero, compactar la masa uniendo los granos y dar al queso el formato deseado, el prensado varía mucho en intensidad y duración dependiendo del tipo de queso.

**8. Salazón:** Se efectúa con las finalidades de impartir cualidades de sabor que lo hace mas apetecido, dar al producto mayor conservación, inhibir o retardar el desarrollo de

microorganismos indeseables y seleccionar la flora normal del queso, influyendo en la solubilidad de los compuestos nitrogenados y facilitar en ciertas condiciones la salida del suero. La cantidad de sal en el queso puede variar de 0,8 – 2% pero en algunas variedades se usa hasta 5-8%.

**9. Maduración del queso:** También se le conoce con el nombre de afinado. Esta es la etapa final de la fabricación del queso, a excepción de los quesos frescos, los cuales no pasan por esta operación.

El objetivo de la maduración es obtener en el queso propiedades específicas, en cuanto al sabor, textura, aspecto y consistencia. También se producen cambios en el valor nutritivo del queso y en su digestibilidad.

Químicamente hablando, se producen los siguientes cambios pérdida de humedad, destrucción de la lactosa (glicolisis), neutralización o desaparición parcial del ácido láctico, consecuentemente, elevación del pH, degradación de las proteínas, la solubilización parcial de las proteínas, solubilización parcial de la caseína (proteólisis), consecuentemente modificación de la textura, hidrólisis de la grasa (lipólisis) y degradación de los ácidos grasos. (Alvares, [199-]).

#### **10. Recuento de esporas congeladas.**

Antes de realizar la inoculación de las esporas en la leche es necesario realizar el conteo de esporas suspendidas en el agua estéril; la cantidad de células viables se determinó a través de la cámara de Neubauer en el microscopio con el lente de 40x. Al determinar la concentración en la que se encuentra las células de esporas se podrá decidir hacer o no una disolución para posteriormente inocularlos al sustrato con el que se pretende elaborar el queso azul. Para hacer el conteo se procedió de la siguiente forma:

1. Se descongelaron las esporas y se tomo una muestra por cada medio en el que crecieron (Agar YMG, Agar Sabouraud).
2. Posteriormente se agitó convenientemente con un agitador mecánico (vortex).
3. A continuación se realizó una dilución tomando 100µl de esporas y 900 µl de agua destilada.
4. Luego se tomaron 50µl de esporas diluidas y se las colocó en las ranuras de la cámara de Neubauer y luego observamos en el microscopio.
5. Para determinar la cantidad de esporas se tuvo que sacar un promedio de diferentes cuadrantes elevando al factor de dilución ( $10^9$ ).

## 11. Resultados del conteo de esporas

Los resultados del conteo de esporas son los siguientes:

- ❖ Las esporas que se desarrollaron en agar YMG estaban en una cantidad  $6 \cdot 10^9$  esporas por ml.
- ❖ En cuanto a las esporas que se desarrollaron en agar Sabouraud se encontraban en una cantidad de  $11 \cdot 10^9$  esporas por ml.

Una vez que se determinó la cantidad de esporas viables se procedió a realizar una dilución de las esporas para evitar que se saturen y así facilitar su desarrollo en el medio que se inoculó.

### 3.1.1 Descripción del proceso tecnológico

En el proceso que se llevo a cabo para elaborar el queso se describe a continuación:

1. Se utilizó 6 litros de leche de vaca entera, se pasteurizó a  $72^\circ\text{C}$  por 15 segundos y luego se enfrió a  $40^\circ\text{C}$ .
2. Se adicionó 0,5% de cultivo láctico mesófilo homofermentativo; se adicionó 1ml del *Penicillium* y se incubo por 30 minutos.

3. Luego se agregó 0,12g de cuajo y se dejó en reposo hasta que coagule.
4. Una vez que se formaron los coágulos se procedió a realizar el corte con la lira y se dejó en reposo por 10 minutos.
5. Posteriormente se procedió a drenar el suero, se colocó la cuajada en los moldes, y se prensó toda la noche.
6. Una vez que los quesos han eliminado la mayor cantidad de suero que sea posible, se procede a pesarlo para salarlo por frotación, proceso que se repite por cuatro días. La sal se coloca en una cantidad del 2%.
7. Transcurrido el tiempo de salación se procedió a realizar los agujeros en el queso.
8. Posteriormente se los colocó en la cámara de maduración a una temperatura de que variaba entre los 18°C y los 20°C y una humedad relativa que estaba entre los 87% y 90%; cada dos días se volteaba los quesos. El tiempo que el queso de pasta azul tardó en madurar fue de 50 días.
9. Al concluir el tiempo de maduración de los quesos se procedió a envolverlos en papel aluminio y se los mantuvo en refrigeración. (Alvares,199-).

Cabe mencionar que en algunas páginas de internet consultadas señalan que, la cantidad de *Penicillium* que se debe colocar es de 1g para 1000litros de leche, pero esto es en el caso de esporas de hongos liofilizadas; en mi caso como no disponía de este tipo de cultivo, se realizó diluciones de las esporas suspendidas en agua estéril que se logró obtener dado que se encontraban en una gran cantidad que variaba de  $6 \cdot 10^9$  a  $11 \cdot 10^9$  esporas/ml por lo tanto al poner directamente estas cantidades de esporas en el sustrato se hubieran saturado lo cual hubiese impedido su desarrollo normal.

Además se realizó pruebas microbiológicas de la leche las cuales se estaban dentro de los límites establecidos por las normas. En el anexo 8 se puede apreciar el desarrollo del hongo en los quesos y en el anexo 2 se observa el diagrama de proceso.

### **3.2 AMBIENTE PARA LA AFINACIÓN DE LA MADURACIÓN DE LOS QUESOS DE PASTA AZUL**

La maduración de los quesos es un hecho dinámico donde varios fenómenos físicos y bioquímicos se presentan, unos en forma simultánea y otros en forma sucesiva y que provocan cambios estructurales y organolépticos que dan origen a distintos tipos de quesos. Según el tipo de queso que se trate, la profundidad de esos cambios será variable y podrá demorar de unos días a 24 meses, para alcanzar en esos tiempos, las características que le corresponden.

Los distintos componentes se degradarán selectivamente en mayor o menor grado dependiendo también de que queso se trate, pero no sólo habrá cambios en ellos, sino que se producirán también cambios de pH, humedad, potencial de óxido reducción, actividad del agua, entre otros. La transformación de estos fenómenos complejos y variables dependen de:

- ❖ La naturaleza del sustrato, en nuestro caso leche, queso y sus componentes.
- ❖ La variabilidad de los agentes responsables de estas transformaciones (enzimas).
- ❖ Las condiciones del medio.
- ❖ Los cambios encadenados que se van produciendo en los componentes iniciales del queso.
- ❖ A la interacción entre los compuestos formados (provenientes de los componentes de la leche), dando origen a nuevos y variados componentes.

#### **3.2.1 Agentes de la maduración de los quesos**

-Enzimas coagulantes. No sólo coagulan la leche, sino que también intervienen en la proteólisis de las proteínas (caseína). En general sólo degradan la caseína en grandes polipéptidos que no inciden en las características del queso, pero sirven como sustrato de otras enzimas, generalmente bacterianas.

-Enzimas bacterianas provenientes de cultivos empleados. Se consideran factor principal en la maduración. Según el tipo de microorganismo empleado, será su sistema enzimático y los cambios que se produzcan. Algunas actuarán en la masa y otras desde y en la superficie del queso.

-Enzimas de la leche o proteasas nativas. La plasmina se destaca entre ellas, esta no es afectada por la pasteurización, y tal vez se vea activada por ella al destruir un inhibidor de la activación de plasmígeno a plasmina.

### **3.3 FACTORES QUE INCIDEN EN LA MADURACIÓN**

Los factores que intervienen en el afinado o maduración del queso azul son: actividad del agua, temperatura, tiempo, aireación y composición de la atmósfera.

#### **3.3.1 La actividad del agua $A_w$**

La actividad del agua representa en cierta forma, la disponibilidad de agua total de un producto para las diferentes reacciones que precisan de una fase acuosa. La máxima actividad es cuando ésta es 1.

La mayoría de las bacterias lácticas tiene una actividad que ronda entre 0,98 y 0,92. Cuando mayor sea la  $A_w$ , acercándose a 1, mejor se podrán desarrollar las bacterias.

Los principales elementos que influyen sobre la actividad del agua en el queso son:

- 1) Contenido de agua del queso. A mayor humedad, más rápida la maduración.
- 2) Contenido de sal. A mayor contenido de sal menor  $A_w$ . Es uno de los principales elementos a considerar, incidiendo mucho en la actividad bacteriana. A medida que avanza la maduración, aumenta la  $A_w$  por pérdidas de humedad del queso.
- 3) Aumento del contenido de Nitrógeno soluble, por lo tanto a medida que avanza la maduración y descomposición proteica, menor será la  $A_w$ . (Martegani, 2007).

### 3.3.2 La temperatura

El factor principal de control y conducción de la maduración es la temperatura a que se somete y mantiene el producto. Las temperaturas usadas para conservar y madurar los quesos varían entre 5-16 °C, según el tipo de queso; las temperaturas más altas aceleran en cierto modo la maduración y las más bajas la retardan. A temperatura más alta el queso pierde más humedad que a temperatura más baja.

La maduración de los quesos a temperaturas bajas da como resultado lo siguiente:

- ❖ Un mejor queso de calidad.
- ❖ Un menor crecimiento de hongos.
- ❖ Una calidad más uniforme
- ❖ Menor pérdida de humedad

Generalmente para los quesos medio duros y duros se acostumbra conservarlos entre 10-12°C y de 12-14°C.

### 3.3.3 Tiempo

El tiempo es un factor el cual va a depender del tipo de queso y de las características organolépticas que se deseen obtener del queso que se ha sometido a maduración, pues el tiempo de maduración va a variar ya que puede durar días o meses.

### 3.3.4 Aireación y composición de la atmósfera

Los requerimientos de oxígeno en las bacterias son diversos. Así encontramos que las bacterias propiónicas requieren muy bajo nivel, las bacterias lácticas en general y especialmente los *Lactobacillus* son microaerófilos o sea que se desarrollan con contenidos bajos de oxígeno, mientras que otros son estrictamente aerobios, como levaduras mohos y micrococos que se desarrollan en la superficie. En el caso del

*Penicillium* que se desarrolla en el interior del queso, hay que darle las condiciones adecuadas de aireación, lo que se logra “pinchando” el queso. (Martegani, 2007).

### **3.4 CÁMARA DE MADURACIÓN**

Con el fin de establecer los requisitos adecuados de temperatura y humedad para la maduración del queso de pasta azul se adaptó una cámara de maduración a las condiciones experimentales de laboratorio. Los materiales utilizados fueron:

- ❖ Hielera térmica de espuma flex
- ❖ Higrómetro
- ❖ Papel aluminio
- ❖ Soporte de acero inoxidable
- ❖ Alcohol

La hielera fue forrada con papel aluminio y posteriormente se la desinfectó con alcohol, en su interior se colocó un soporte de acero inoxidable previamente desinfectado con alcohol potable, en el soporte se colocó el queso, finalmente se colocó un higrómetro para controlar la temperatura y el porcentaje de humedad relativa. Se mantuvo al queso en la cámara hasta que cumpla su etapa de maduración, posteriormente se procedió a realizar pruebas microbiológicas, pruebas de tipificación, pruebas físico-químicas y una evaluación sensorial para determinar el grado de aceptación del queso elaborado.(Ver anexo7).

### **3.5 PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS DEL QUESO**

Esta prueba se realizó con la finalidad de verificar que los resultados obtenidos se encuentran dentro de los parámetros establecidos por la norma del Codex Alimentario argentino. Las pruebas que se realizaron fue de coliformes, estafilococos, salmonella y listeria, para estos análisis se tuvo que preparar los siguientes medios de cultivos:

- ❖ Agar Chromocult para coliformes y salmonella
- ❖ Agar Manitol para Estafilococos
- ❖ Petrifilm para Listeria
- ❖ 180 ml de agua peptona para diluir la muestra.

Estos análisis se realizaron tomando 10gr de queso azul por cada lote de queso elaborado posteriormente se procedió a diluir la muestra en 90 ml de agua peptona.

Se siembra la primera dilución tomando 1000 $\mu$ l ( $10^{-1}$ ) en las cajas petri y sobre esto colocar el medio de cultivo.

Luego se toma 100 $\mu$ l de la primera dilución (10gr. Muestra + 90 ml de agua peptonada) y se obtiene la segunda dilución  $10^{-2}$  se siembra en las cajas y se coloca en medio de cultivo.

Así mismo se toma 100 $\mu$ l de la primera dilución y se coloca en 90ml de agua peptona, posteriormente se toma 1000 $\mu$ l de esta segunda dilución  $10^{-3}$  y se procede de la misma forma y lo mismo se realiza para  $10^{-4}$  pero con 100  $\mu$ l de la segunda dilución. Luego se incuba por 48 horas a 37°C y se revisan los resultados.

### **3.6 EVALUACIÓN SENSORIAL DEL QUESO DE PASTA AZUL**

Se realizó una prueba sensorial de aceptación y comparación a un panel de 30 personas no entrenadas se selecciono este panel por su habilidad, disponibilidad, interés y desempeño. En ella los degustantes evaluaron: Color, Textura, Impresión Global, Aroma, Sabor, Sensaciones Trigeminales. Se utilizó una escala de 1 a 4, en donde: 1 es suave; 2 es moderadamente fuerte; 3 es fuerte; 4 es extremadamente fuerte.

Para realizar la degustación de los quesos se utilizó galletas de sal (saltinas). Los puntos evaluados se aprecian en el anexo 1. A continuación se describen los siguientes puntos:

- ❖ **Apreciación del color del queso de pasta azul:** El color de los quesos va a depender del tipo de leche empleado, la técnica de elaboración y por el tiempo de maduración. De acuerdo a lo que se investigó este parámetro varía en el queso azul pues puede ser blanco a blanco amarillento, con vetas características de color verde, verde azulado o verde grisáceo.

En este parámetro sensorial se determinó previo a la encuesta que los colores a revisar serían: blanco, blanco amarillento, blanco cremoso y blanco parduzco. No se tomó en cuenta la escala de 1 a 4 para este parámetro.

#### ❖ **Textura**

Los parámetros en los que se evaluó la textura del queso de pasta azul son:

- **Fundente:** Sensación que se manifiesta cuando la muestra forma una pasta con la saliva y funde continuamente dando una percepción de presencia en la boca.
- **Plástico:** Que puede deformarse lentamente en la boca antes de romperse.
- **Fibroso:** Parecido al colenquima del apio.
- **Rechinante:** Sensación auditiva del tipo tapón de corcho.
- **Crujiente:** Sensación auditiva que acompaña a la masticación de un queso con cristales. (Sancho J, 2002).

#### ❖ **Impresión global**

Son descriptores de estados referidos a la textura, que se utiliza con frecuencia, y los cuales citamos a continuación:

- **Cerrado/ compacto:** Producto cuyos elementos constitutivos tienen cohesión y dejan poco espacio entre ellos:
- **Gomoso:** Producto cuya consistencia plástica se hace maleable bajo un cierto esfuerzo.

- **Pastoso:** Adherentey debilmente harinoso a la vez.
- **Dúctil:**Que fácilmente se deja deformar varias veces, no recuperando completamente el estado inicial.
- **Grumoso:** Forma granos con la saliva cuando se le mastica.
- **Compleativo:** Que forma granos durante la masticación, granos que funden mal y se dispersan por toda la boca.(Sancho J, 2002).

#### ❖ Aroma

Para la evaluación del aroma se utilizó los siguientes descriptores:

- **Lácticos** (leche fresca, acidificada, corteza de queso). (Sancho J, 2002).
- **Vegetales** (hierba, verdura cocida, ajo, cebolla, madera). (Sancho J, 2002).
- **Florales** (miel, rosa). (Sancho J, 2002).
- **Afrutados** (avellana, nuez, cítricos, plátano, piña, manzana, aceites). (Sancho J, 2002).
- **Torrefactos** (bizcocho, vainilla, caramelo, tostado). (Sancho J, 2002).
- **Animales** (vaca, establo, cuajo, estiércol). (Sancho J, 2002).
- **Especias** (pimienta, menta, clavo de olor). (Sancho J, 2002).
- **Otros** (propiónico, rancio, jabón, ensilado). (Sancho J, 2002).

#### ❖ Sabor

Los parámetros a evaluar fueron: Dulce,Salado,Ácido,Amargo, Humámico.Según el Codex Argentino, el queso de pasta azul debe ser salado, y picante

#### ❖ Sensaciones trigeminales

Son sensaciones irritantes o agresivas que se perciben en la cavidad bucal y que se acompañan de picores, de contracciones, de calor, de frescor o simplemente de irritación mas o menos molesta. Los descriptores evaluados son:

- **Picante:** Sensación que se manifiesta en la boca en forma de picores pudiendo llegar a ser dolorosos. (Sancho J, 2002).
- **Astringente:** Es una sensación compleja resultante de la contracción de las mucosas de la cavidad bucal que se procede como un resecamiento parcial. (Sancho J, 2002).
- **Ardiente:** Califica a las sustancias que producen una sensación de recalentamiento en la cavidad bucal semejante a la provocada por el alcohol, la pimienta. (Sancho J, 2002).
- **Refrescante:** Califica a las sustancias que producen una sensación de frío en la cavidad bucal . (Sancho J, 2002).
- **Metálico:** Califica a las sustancias que producen una sensación de picores eléctricos , sobre todo en la lengua y las encías. (Sancho J, 2002).
- **Acre:** Se denomina así a productos que como el humo, provocan una sensación de irritación en la mucosa de la parte posterior de la cavidad bucal. (Sancho J, 2002).
- **Moho.** Sabor característico de humedad y hongos. (Sancho J, 2002).

## CAPITULO IV

### RESULTADOS

#### 4.1 ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DEL QUESO DE PASTA AZUL

Los análisis físico-químicos que se efectuaron a los quesos azules fue después de que concluyó la etapa de maduración de dicho queso, para realizar cada prueba se tomo una muestra por cada lote y se efectuaron las pruebas de humedad, grasa, proteína, cenizas y pH y se obtuvo los resultados que se describen en el siguiente cuadro; cabe mencionar que cada prueba se realizó por duplicado y luego se saco una media.

CUADRO 4: RESULTADO DE LOS ANÁLISIS QUÍMICOS

Descripción	%Humedad	%Grasa	Proteínas g/100gr.	Cenizas g/100gr.	Ph
Muestra	57,48	40	17,54	3,21	4,7

#### 4.2 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL QUESO DE PASTA AZUL

##### 4.2.1 Prueba de tipificación del queso azul

Se realizaron varias pruebas de tipificación a cada lote de queso de pasta azul, este análisis tiene una gran importancia pues a través de esto se pudo determinar si el hongo que se ha desarrollado en el queso es el *Penicillium roqueforti* que se inoculó a la leche con la que se elaboró el queso en mención.

Para realizar la tipificación se procedió a aislar el *Penicillium* que se desarrolló en los quesos, se tomó una muestra por queso, posteriormente se procedió a sembrar en agar malta. Luego se purificó el hongo que creció en el medio, y enseguida se elaboró microcultivos con las muestras tomadas. Los microcultivos se elaboraron de la misma

manera que se describe en el capítulo II. Transcurrido el tiempo de incubación de los microcultivos se procedió a observar en el microscopio.(Ver anexo 6).

#### 4.2.2 Observación del desarrollo en el agar Malta

El agar que se utilizó para la siembra del *Penicillium* fue el MEA (agar extracto de malta) se observó un crecimiento rápido y con un diámetro de 40 a 60 mm, son planos y bajos, son estrictamente voluminosos al inicio del crecimiento. Presentan un micelio copioso, de color blanco, poseen una producción de conidios moderada a fuerte, los márgenes son de color turquesa grisáceo y tienen un color predominante de verde oscuro. Al reverso del cultivo son pálidos, aunque también pueden ser de color café, verde o fuertemente verde azulado. Cuando se observa en el microscopio el *Penicillium roqueforti* tiene la forma de una mano con muchas ramificaciones.

#### 4.2.3 Resultados de las pruebas microbiológicas del queso

Las pruebas microbiológicas efectuadas al queso de pasta azul se muestran en el siguiente cuadro:

CUADRO 5: RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

Descripción	Coliformes ufc/gr.	Estafilococos <i>aureus</i> ufc/gr.	Salmonella Presencia o ausencia	Listeria <i>monocytogenes</i> Presencia o ausencia
Muestra 1	6000	200	Ausencia	Ausencia
Muestra 2	2000	500	Ausencia	Ausencia

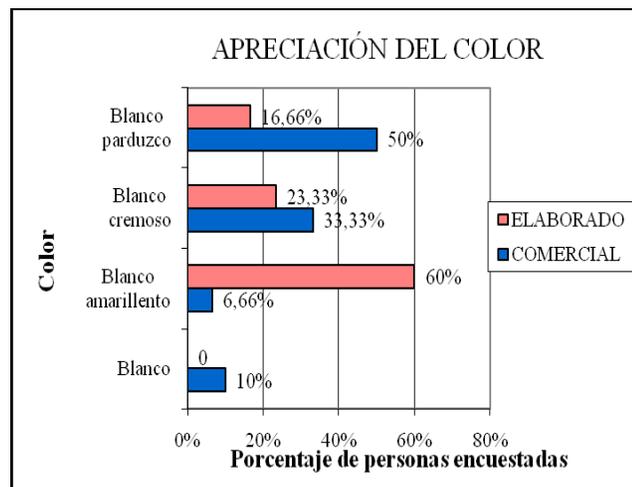
Ver capítulo 1 Criterios microbiológicos.

### 4.3. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN SENSORIAL DEL QUESO DE PASTA AZUL

Los resultados obtenidos de la evaluación sensorial se aprecian a continuación:

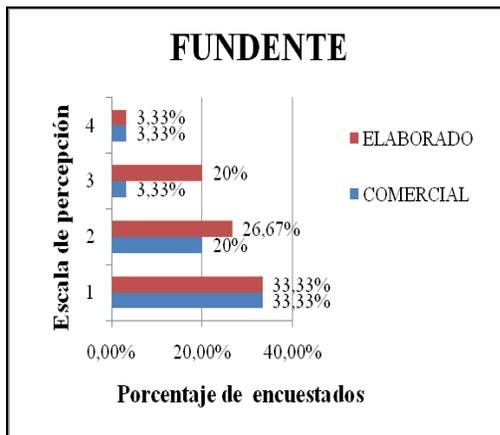
- ❖ **Color:** En cuanto a este parámetro el 60% de las personas encuestadas señalan que el queso elaborado para este proyecto de tesis, posee un color blanco amarillento; mientras que el 50% indican que el queso comercial posee un color blanco parduzco.

GRÁFICO 1: RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DEL COLOR



- ❖ **Textura:** De acuerdo con definiciones descritas en el capítulo III inciso 3.6 literal b, el 33,33% de personas encuestadas indican que las dos muestra son suavemente fundentes, el 13,33% indica que el producto comercial es moderadamente fuerte en cuanto a plasticidad, otro grupo de encuestados determinó que el queso comercial es moderadamente fuerte en fibrosidad y el 3,33 % indica que es moderadamente fuerte en rechinidad. Lo que determina que el queso de pasta azul elaborado en esta tesis es suavemente fundente.

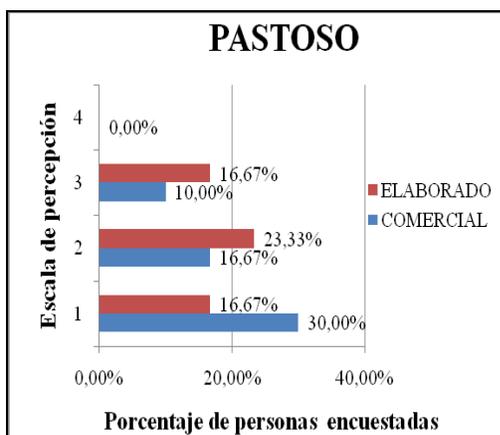
GRÁFICO 2: RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LA TEXTURA



❖ **Impresión global:** Según las definiciones descritas en el capítulo III inciso 3.6 literal c, el 6,67% de las personas encuestadas señalan que las dos muestras tienen una suave cohesión y dejan poco espacio entre ellos; y el 6,67% dicen que el queso comercial es gomoso suave.

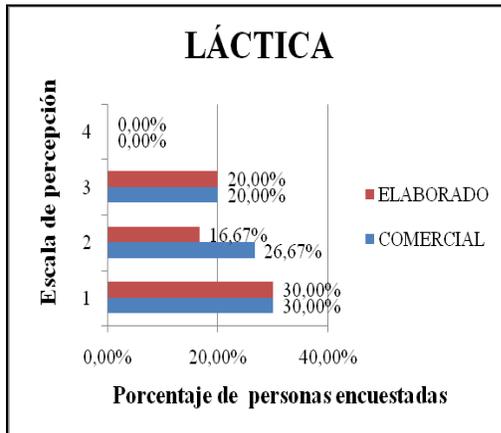
De estos parámetros revisados los encuestados indicaron, el 30 % de ellos que el queso de pasta azul comercial es suavemente pastoso y el 23.33% dicen que el queso elaborado para la tesis es moderadamente fuerte en su pastosidad.

GRÁFICO 3: RESULTADOS DE EVALUACIÓN DE LA IMPRESIÓN GLOBAL



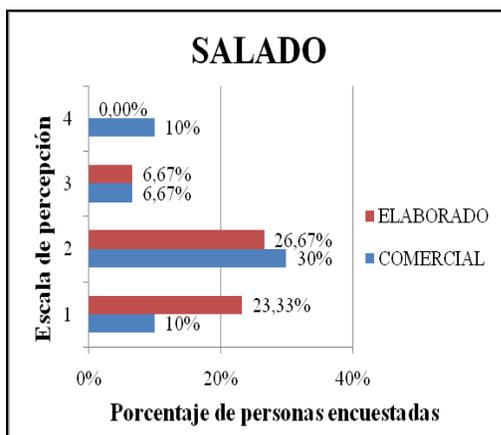
- ❖ **Aroma:** El 30% de los encuestados concuerdan en que las dos muestras tienen un aroma suavemente láctico.

GRÁFICO 4 : RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DEL AROMA



- ❖ **Sabor:** El 30 % de los encuestados indican que el queso comercial es moderadamente fuerte salado, y el 26,67 % dice que el queso elaborado tiene la misma característica. En cuanto a los otros parametros los panelistas indicaron en diferentes proporciones los otros sabores.

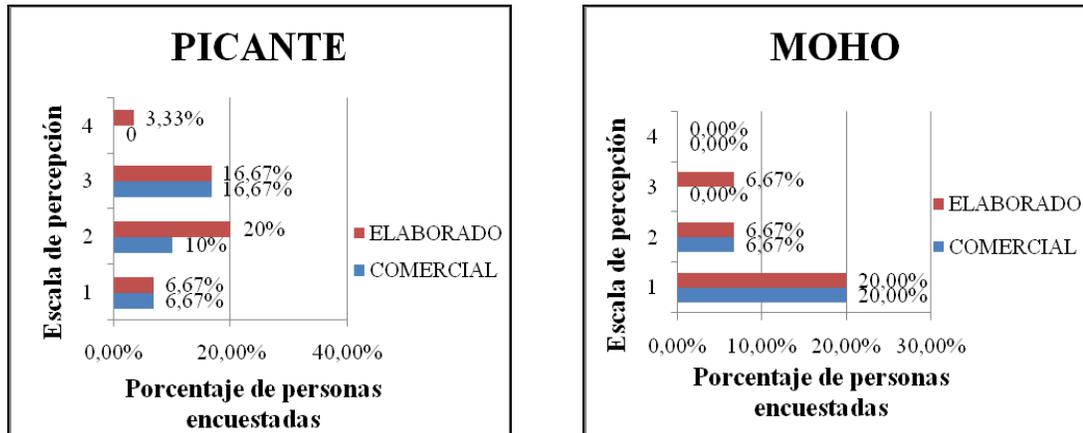
GRÁFICO 5: RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DEL SABOR



- ❖ **Sensaciones trigeminales:** El 20% de los jueces identifico al queso elaborado como moderadamente fuerte picante, así como el 16.67 % considera que los dos tipos de

quesos son fuertemente picante. También el 20% de los encuestados tiene la sensación que los dos quesos saben a moho.

GRÁFICO 6: RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LAS SENSACIONES TRIGEMINALES



- ❖ Se realizó al final de la encuesta la pregunta de: ¿cuál de los dos quesos le agrada más?. A lo cual los jueces indicaron su preferencia por la muestra elaborada en este proyecto de tesis.

GRÁFICO 7: RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE ACEPTACIÓN DEL QUESO



Según el Codex Argentino artículo 627 incisos 2.1.2 (características sensoriales) para alimentos de este tipo, indica que:

- El color del queso de pasta azul va desde un color Blanco a blanco amarillento, uniformes, con vetas características de color verde, verde azulado o verde grisáceo.
- Para la textura indica que debe tener una consistencia Semidura desmenuzable o semiblanda pastosa. Abierta, con desarrollo de mohos distribuidos de manera razonablemente uniforme, con vetas características.
- Su aroma debe ser característico acentuado
- En cuanto al sabor este debe ser picante, salado, característico.

Como podemos observar el queso azul que fue elaborado para este trabajo cumple con las características sensoriales que el Codex argentino describe para el queso azul y es el que mayor aceptación tiene por los catadores.

#### **4.4 PROPUESTAS DE DEGUSTACIÓN DEL QUESO DE PASTA AZUL**

El queso de pasta azul es un producto que se puede consumir como tal, pero es innegable su valor culinario, pues es muy utilizado para preparar exquisitos platillos tales como: canapés, salsas, Peras Savarin, para aderezos, etc., todo va de acuerdo a la preferencia de cada consumidor; además este queso se puede comer después de la comida, untándole sobre el pan sin mantequilla. También es muy delicioso en salsas cremosas para pasta, ensaladas, derretido sobre peras o con higos.

#### **4.5 CONDICIONES DE EMPAQUE PARA EL QUESO DE PASTA AZUL**

El queso puede recubrirse antes de la maduración, durante el proceso de maduración o una vez que la maduración ha acabado. Cuando se utiliza un recubrimiento durante la maduración, la finalidad de ese recubrimiento es regular el contenido de humedad del queso y proteger el queso de los microorganismos.

El recubrimiento de un queso se realiza para proteger el queso contra microorganismos y otros contaminantes, para protegerlo contra los daños materiales que pudiera sufrir

durante el transporte y la distribución y/o para darle un aspecto concreto (por ejemplo, un determinado color). El recubrimiento se distingue fácilmente de la corteza, ya que está hecho con un material distinto del queso y muy a menudo se puede eliminar frotándolo, raspándolo o despegándolo; a continuación se describen algunos de los recubrimientos de quesos que son muy utilizados en la industria:

- Una película, muy a menudo de acetato de polivinilo, pero también de otro material artificial o de un material compuesto de ingredientes naturales, que contribuye a regular la humedad durante la maduración y protege al queso contra los microorganismos.
- Una capa, la mayoría de las veces de cera, parafina o plástico, que suele ser impermeable a la humedad, para proteger el queso después de la maduración contra microorganismos y contra daños materiales durante la manipulación en la venta al por menor y, en algunos casos, para mejorar la presentación del queso.
- Envases o envolturas plásticas que pueden ser bolsas de Poli-Etileno de Baja Densidad y al vacío o no, también se lo puede envolver en papel aluminio o estaño con o sin vacíos acondicionados en envases o envolturas bromatológicamente aptos. (Codex, 2007).

El queso azul debe conservarse hasta y durante su expendio a una temperatura no superior a los 8°C, por tal razón una vez que los quesos son empacados son llevados al cuarto frío de almacenamiento de producto terminado manteniéndose la temperatura a 4-8° C para garantizar una vida útil .

#### **4.6 ETIQUETADO Y ROTULACIÓN DEL QUESO DE PASTA AZUL**

Se denomina etiquetado a cualquier material escrito, impreso o gráfico que contiene la etiqueta, acompaña al alimento o se expone cerca del alimento, incluso el que tiene por objeto fomentar su venta o colocación. Para efectuar el etiquetado se debe tener presente las disposiciones de la Norma General del Codex para el Etiquetado de los Alimentos Preenvasados (CODEX STAN 1-1985) y la Norma General para el Uso de Términos

Lecheros (CODEX STAN 206-1999), de acuerdo a estas normas se aplicarán las siguientes disposiciones específicas:

#### 4.6.1 Denominación del alimento

La denominación del alimento deberá ser queso. No obstante, podrá omitirse la palabra “queso” en la denominación de las variedades de quesos individuales reservadas por las normas del Codex para quesos individuales, y, en ausencia de ellas, una denominación de variedad especificada en la legislación nacional del país en que se vende el producto, siempre que su omisión no suscite una impresión errónea respecto del carácter del alimento.

En caso de que el producto no se designe con el nombre de una variedad sino solamente con el nombre "queso", esta designación podrá ir acompañada por el término descriptivo que corresponda:

CUADRO 6: DENOMINACIÓN DEL QUESO SEGÚN SUS CARACTERÍSTICAS DE CONSISTENCIA Y MADURACIÓN

Según su consistencia: Término 1		Según las principales características de maduración: Término 2
HSMG %	Denominación	
<51	Extraduro	Madurado
49-56	Duro	Madurado por mohos
54-69	Firme/Semiduro	No madurado/Fresco
> 67	Blanco	En salmuera

La HSMG equivale al porcentaje de humedad sin materia grasa.

#### 4.6.2 Declaración del contenido de grasa de la leche

Deberá declararse en forma aceptable el contenido de la grasa de la leche en el país en que se vende al consumidor final, bien sea, i) como porcentaje por masa, ii) como porcentaje de grasa en el extracto seco, o iii) en gramos por ración cuantificada en la

etiqueta, siempre que se indique el número de raciones. Podrán utilizarse además las expresiones que se describen en el siguiente cuadro:

CUADRO 7: PORCENTAJES DE GRASA DE LA LECHE

Extragraso	(si el contenido de GES es superior o igual al 60%)
Graso	(si el contenido de GES es superior o igual al 45% e inferior al 60%)
Semigraso	(si el contenido de GES es superior o igual al 25% e inferior al 45%)
Semidesnatado (Semidescremado)	(si el contenido de GES es superior o igual al 10% e inferior al 25%)
Desnatado (descremado)	(si el contenido de GES es inferior al 10%)

GES: Grasa en Extracto Seco.

Fuente: CODEX STAN A-6-1978

#### **4.6.3 Marcado de la fecha**

No obstante las disposiciones de la Norma General para el Etiquetado de los Alimentos Preenvasados (CODEX STAN 1-1985), no será necesario declarar la fecha de duración mínima en la etiqueta de los quesos firmes, duros y extraduros que no sean quesos madurados con mohos/blandos y que no se destinan a ser comprados como tales por el consumidor final: en tales casos se declarará la fecha de fabricación.

#### **4.6.4 Etiquetado de envases no destinados a la venta por mayor**

La información requerida en la sección 7 de esta Norma y las secciones 4.1 a 4.8 de la Norma General para el Etiquetado de los Alimentos Preenvasados (CODEX STAN 1-1985), y, en caso necesario, las instrucciones para la conservación, deberán indicarse bien sea en el envase o bien en los documentos que lo acompañan, pero el nombre del producto, la identificación del lote y el nombre y la dirección del fabricante o envasador deberán aparecer en el envase. No obstante, la identificación del lote y el nombre y la dirección del fabricante o del envasador podrán ser sustituidos por una marca de

identificación, siempre y cuando dicha marca sea claramente identificable con los documentos que lo acompañan.

## CONCLUSIONES

Una vez que ha finalizado el proceso de maduración del queso de pasta azul, y se obtuvieron los resultados mencionados en el capítulo anteriormente podemos deducir lo siguiente:

1. Con la realización de este trabajo se determinó que es factible elaborar el queso de pasta azul a partir del aislamiento y purificación de cepas de *Penicillium* que se encuentra en un sustrato comercial.
2. En la elaboración de queso azul, es necesario que las cepas de hongo *Penicillium roqueforti* sea de fácil empleo, lo más robusta posible para que se efectúe su desarrollo en el queso. Debe estar desprovista de poder patógeno para evitar intoxicaciones en el consumidor.
3. La leche debe ser obtenida de vacas sanas, llevar a cabo el ordeño en condiciones de higiene. En el momento del proceso tener en cuenta todas las buenas prácticas de higiene y uso de utensilios adecuados.
4. Para obtener el queso azul se tuvo que elaborar varias pruebas experimentales, hasta obtener el producto final puesto que al inicio había muchas variaciones en la temperatura y la humedad, debido a que no se disponía de una cámara de maduración adecuada, razón por la que hubo lotes de quesos que se dañaron.
5. El queso de pasta azul culminó su etapa de maduración exitosamente al tener un ambiente de maduración adecuado en el cual se podía controlar la temperatura y la humedad relativa los cuales oscilaban de 18°C - 20°C y 87% a 90% de HR respectivamente, esto fue lo que hizo que el hongo desarrolle en el queso dándole el aroma y sabor característico.

6. Los análisis microbiológicos que se efectuaron al queso se encuentran dentro de los límites establecidos por la norma Codex.
7. Al efectuar el análisis de tipificación del queso se pudo comprobar que el moho que se ha desarrollado en el interior y en el exterior del queso es el *Penicillium roquefortii* que se inoculó a la leche para elaborar el queso. Esta conclusión se obtuvo luego del análisis de un microcultivo del hongo crecido en los productos elaborados.
8. Con la evaluación sensorial de aceptación del queso azul elaborado y comparación con un queso azul comercial; se pudo determinar que el queso que se elaboró para esta tesis tiene mayor aceptación y su diferencia es escasa tal como lo podemos observar en los datos obtenidos de la encuesta.

## BIBLIOGRAFÍA

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ALVARES, Edgar. Procesamiento de productos lácteos a pequeña escala, Edición única, impreso en los talleres de la universidad de cuenca [199-].
- BADUI DERGAL, Salvador. Química de los Alimentos, México, Editorial Alhambra Mexicana S.A, 1993.
- BOURGOIS, C.M., MESCLE, J.F., ZUCCA, J. Microbiología Alimentaria. Volumen I. Aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria, España, Editorial Acribia, 1994.
- BOURGEOIS C.M., LARPENT J.P. Microbiología alimentaria, 2<sup>da</sup> edición, Editorial Acribia S.A, Zaragoza (España) 1995.
- BREVIS, P., PADILLA C. Manual de Microbiología General, Talca, Chile, Universidad de Talca, Facultad de Ciencias de la Salud, 1996.
- CARPENTER, Philip. Microbiología, 4<sup>ta</sup> edición, nueva editorial interamericana S.A México 1979.
- GILLEN, Pedro. Introducción Quesera, 7ma edición, editorial suelo argentino doblas 1990 Buenos Aires.
- LARRAÑAGA Coll, I., CARBALLO, J., RODRÍGUEZ, M., FERNÁNDEZ, J. Control e Higiene de los Alimentos, España, McGraw-Hill, 1999.

- NANLET, Bernard., RANCE P., BOTKINE F., LYON N., RIBAUT J. Quesos del mundo, 1<sup>ra</sup> edición, Editorial Limusa S.A, México DF,1995.
- PARK TALARO, K., TALARO, A. Foundations in Microbiology, 4<sup>th</sup> ed., USA, Editorial McGraw-Hill, 2002.
- PHILIPL,C. Microbiologia,4<sup>th</sup> ed., México, Nueva Editorial S.A 1979.
- PITT, J. A Laboratory Guide to Common Penicillium Species, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization Division of Food Processing, Published, July 1985.
- PITT, J., HOCKING, A. Fungi and Food Spoilage, London, 2<sup>nd</sup> edition, Blackie Academic & Professional, 1997.
- SANCHO J., BOTA E., CASTRO JJ. Introducción al análisis sensorial de los alimentos, Ediciones universidad de Barcelona, Barcelona –España 2002.
- SCOTT, E., BAILEY, R. Diagnostico Microbiológico, 3<sup>ra</sup> edición, Editorial médica panamericana 1977.
- WILLIAN G. Walter., MCBEE Ricchard H., Temple Kenneth L. Introducción a la microbiología 1<sup>ra</sup> edición, Editorial continental S.A México 1980.

## REFERENCIAS ELECTRÓNICAS:

- BARBERA Eduardo, Envases flexibles en la industria alimentaria.<http://www.alfaeditores.com/alimenpack/Sept%20%20Oct%2005/TECNOLOGIA%20Envases.htm>, 2008-05 -27.
- COSTE Elena Beatriz. Análisis sensorial se los quesos., <http://www.portalechero.com>,2008-05-20.
- CARRILLO Leonor. Los Hongos de los Alimentos y Forrajes. Técnicas, [http://www.TESIS/tecnicas de aislamiento penicillium.htm](http://www.TESIS/tecnicas%20de%20aislamiento%20penicillium.htm).,2007-09-14.
- Codex Alimentario. Disponible en la web: [http://www.Capítulo%20VIII20\(actualiz%206-7-02\)COD ARG. PDF](http://www.Capítulo%20VIII20(actualiz%206-7-02)COD%20ARG.PDF), 2008-01-3.
- Codex Argentino: Disponible en la web: [http://www.Código\\_alimentario\\_argentino\\_lacteos\[1\].pdf](http://www.Código_alimentario_argentino_lacteos[1].pdf),2007-12-26
- GALOPPO, G., Estudios de la flora fúngica presente en embutidos, <http://E:/TESIS?flora%20fungica.htm>. 2007-09-14.
- MARTEGANI, Héctor, Queso azul, <http://www.portalechero.com>, 2007-09-11.
- MARTEGANI, Héctor, Elaboración general de quesos 5ta. Parte, <http://www.portalechero.com>, 2007-09-14.
- MARTEGANI, Héctor, Elaboración general de quesos 2da. Parte, <http://www.portalechero.com>, 2007-10-31.

- MARTEGANI, Héctor, Elaboración general de quesos 5ta. Parte, <http://www.portalechero.com>, 2007-09-14.
- MAULINI R Mauro. Para MIND-Mercadeo Inteligente de Nuevos Desarrollos [http:// www.TESIS\Queso Azul Asturiano de La Peral.htm](http://www.TESIS\Queso Azul Asturiano de La Peral.htm), 2007-09-12.
- Norma General para el Etiquetado de los Alimentos Preenvasados. Disponible en la web: [http://www CODEX STAN 1-1985, Rev. 1-1991,2008-06-04](http://www.CODEX STAN 1-1985, Rev. 1-1991,2008-06-04).
- REYES GONZALES, G., Correa -Franco, M., Producción Biotecnológica de sabores, pigmentos y aromas a partir de hongos miceliales y levaduras, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, [http://www.E/TESIS/3-PRODUCCION%20BIOTECN\\_p65.htm](http://www.E/TESIS/3-PRODUCCION%20BIOTECN_p65.htm). 2007-09-14.
- SHALLER, Aníbal, Quesos, <http://www.analisis de la cadena alimentaria de quesos>, 2007-11-7.

**ANEXOS**

**ANEXO 1: FORMATO DE LA PRUEBA DE DEGUSTACIÓN**

**Muestra de comparación y aceptación.**

**Nombre:** \_\_\_\_\_

**Fecha:** \_\_\_\_\_ **Hora:** \_\_\_\_\_

**Producto:** Queso Maduro

Usted va a probar dos tipos de quesos y pedimos su apreciación acerca de los siguientes parámetros organolépticos: Color, Textura, Impresión Global, Aroma, Sabor, Sensaciones Tridimensionales y por último indique si hay diferencias entre las dos muestras.

**1. Color:** Marque una x de acuerdo a su apreciación.

Muestra	Blanco	Blanco amarillento	Blanco Cremoso	Blanco Parduzco
231				
312				

**2. Textura:** Ponga la siguiente numeración: 1 Suave, 2 Moderadamente fuerte, 3 Fuerte, 4 extremadamente fuerte.

Muestra	Fundente	Plástico	Fibroso	Rechinante	Crujiente
231					
312					

**3. Impresión Global:** Ponga la numeración de acuerdo a su percepción: 1 Suave, 2 Moderadamente fuerte, 3 Fuerte, 4 extremadamente fuerte.

Muestra	Cerrado/compacto	Gomoso	Pastoso	Dúctil	Grumoso	Compleativo
231						
312						

**4. Aroma:** Ponga la numeración de acuerdo a su percepción: 1 Suave, 2 Moderadamente fuerte, 3 Fuerte, 4 extremadamente fuerte.

Muestra	láctica	Floral	Afrutada	Torrefacta	Animal	Especiada	Otros
231							
312							

**5. Sabor:** Ponga la numeración de acuerdo a su percepción: 1 Suave, 2 Moderadamente fuerte, 3 Fuerte, 4 extremadamente fuerte.

Muestra	Dulce	Salado	Acido	Amargo	Humamico
231					
312					

**6. Sensaciones trigeminales:** Ponga la numeración de acuerdo a su percepción: 1 Suave, 2 Moderadamente fuerte, 3 Fuerte, 4 extremadamente fuerte.

Muestra	Picante	Astringente	Ardiente	Refrescante	Metálico	Acre	Moho
231							
312							

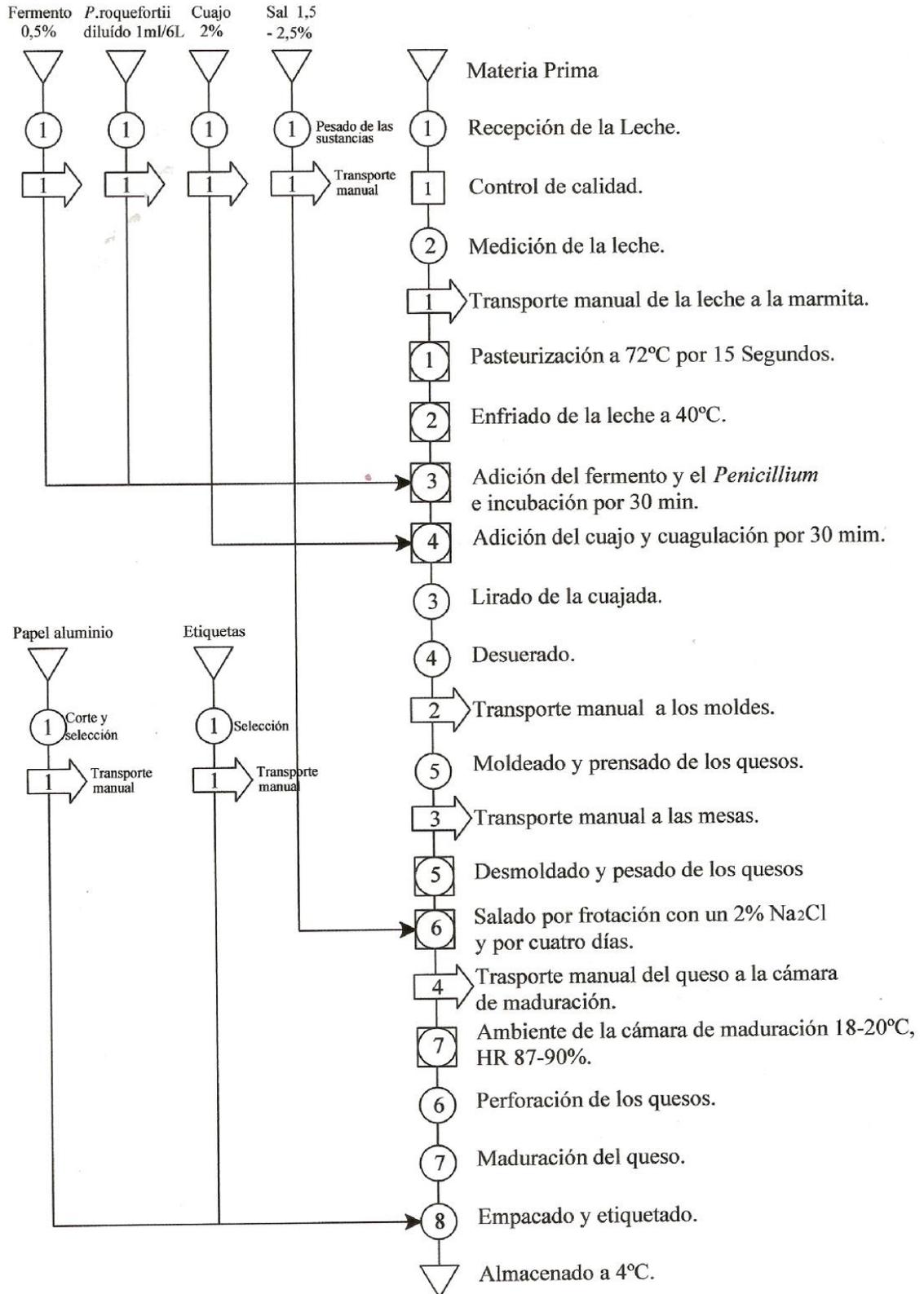
**7. Cuál de las muestras le agrada más:**

231 \_\_\_\_\_

312 \_\_\_\_\_

Gracias por su ayuda.

**ANEXO 2. DIAGRAMA DE PROCESO DEL QUESO DE PASTA AZUL**



**ANEXO 3. FOTOGRAFÍAS DE LOS MATERIALES USADOS  
EN LA INVESTIGACIÓN**



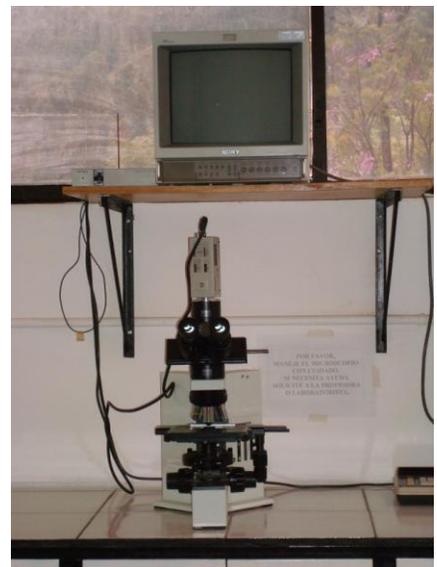
**1. Balanza**



**2. Frascos schott**



**3. Incubadora**

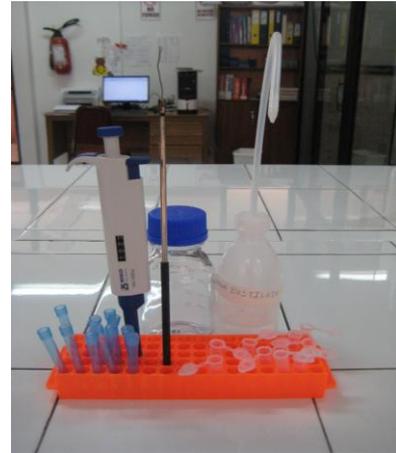


**4. Microscopio**

## ANEXO 4. MATERIALES USADOS PARA EL AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL *PENICILLIUM*



**1. Materiales**



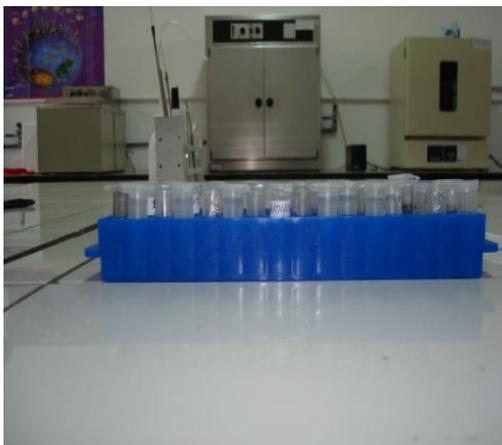
**2. Material para congelar esporas**



**3. Medios de cultivo**



**4. Nistatina**

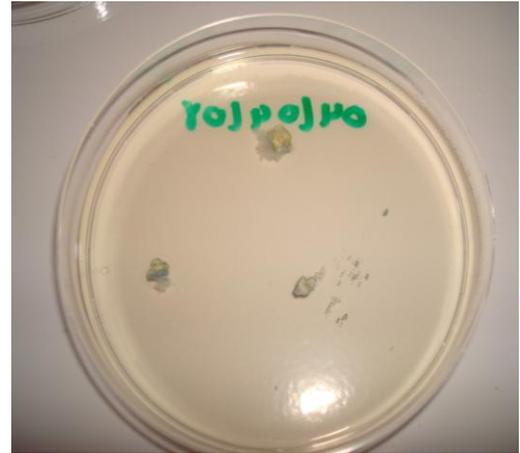


**5. Esporas aisladas**



**4. Agitador Vortex**

**ANEXO 5: DESARROLLO DEL *PENICILLIUM ROQUEFORTII*.**



**1. Siembra del hongo en diferentes medios de cultivo.**



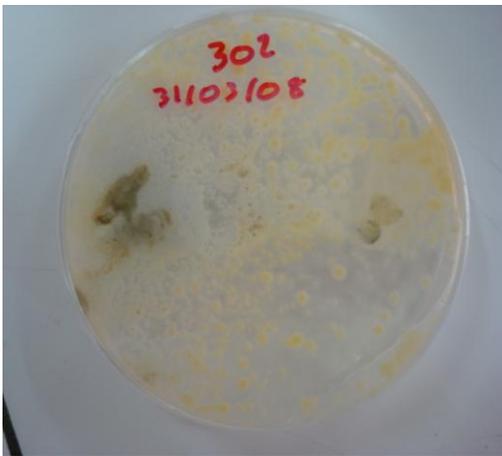
**2. Hongos al segundo día de incubación.**



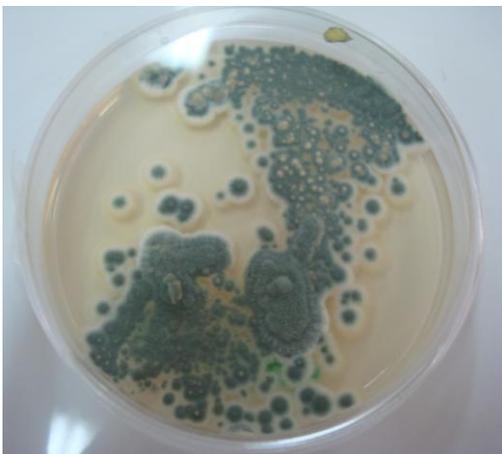
**2.1. Hongos vistos desde la parte de atrás de las cajas petri.**



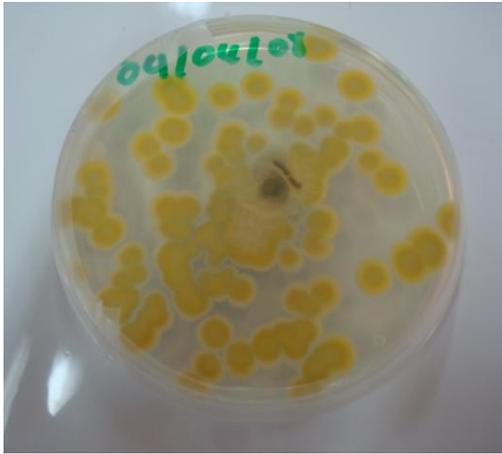
**3. Hongos al tercer día de incubación.**



**3.1. Hongo visto desde la parte de atrás de la caja petri.**



**4. Hongos al cuarto día de incubación.**



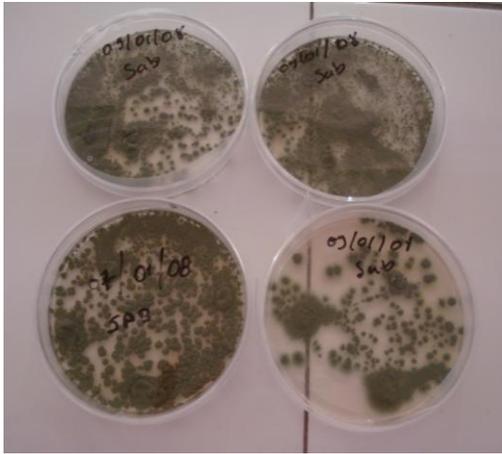
**4.1. Hongos vistos desde la parte de atrás de la caja petri.**



**5. Hongos al sexto día de incubación.**



**5.1. Hongos vistos desde la parte de atrás de la caja petri.**

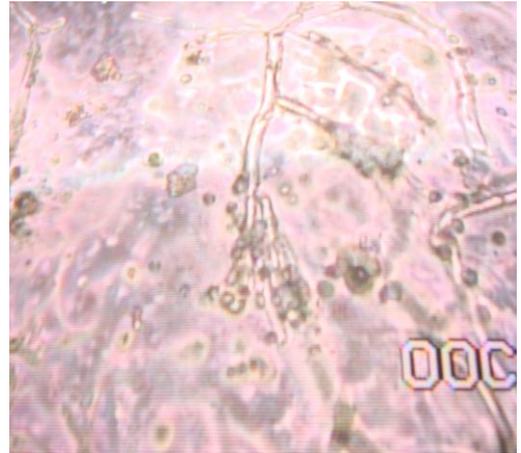


**6. Envejecimiento del *Penicillium***

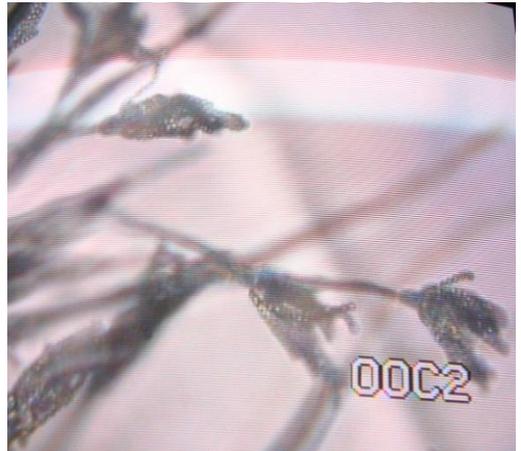


**7. Cámaras de humedad.**

**ANEXO 6: TIPIFICACIÓN DEL *PENICILLIUM ROQUEFORTII***



**1. *Penicillium* observado en el microscopio.**



**2. Forma del *Penicillium* observado en el microscopio.**



**3. *Penicillium* visto en el microscopio.**

## **ANEXOS 7: MATERIALES USADOS PARA ELABORAR LA CÁMARA DE MADURACIÓN**



**1. Hielera de espumaflex, soporte de acero inoxidable, papel aluminio, higrómetro y alcohol.**



**2. Cámaras de maduración elaboradas.**

**ANEXOS 8: PROCESO DE ELABORACIÓN DEL QUESO Y  
DESARROLLO DE L PENICILLIUM EN EL QUESO.**



**1. Primero y segundo lote de producción.**



**2. Tercero y cuarto lote de producción.**



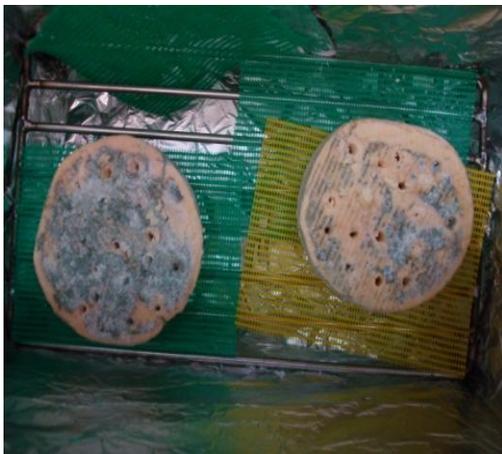
**3. Quesos a los quince días de maduración.**



**4. Quesos a los diecinueve días de maduración.**



**5. Quesos a los veinte días de maduración.**



**6. Quesos a los veintidós días de maduración.**



**7. Quesos a los veintinueve días de maduración.**



**9. Quesos a los treinta y dos días de maduración.**



**9. Quesos a los treinta y seis días de maduración.**



**10. Quesos a los cuarenta días de maduración.**



**11. Quesos a los cuarenta y siete días de maduración.**



**12. Quesos a los cincuenta días de maduración.**



**10. Culminación de la maduración.**



**11. Queso azul luego de realizar la limpieza.**



**12. Queso de pasta azul cortado.**



**13. Queso de pasta azul empacado.**



**14. Queso de pasta azul empacado y etiquetado.**