

**Contribución al estudio de los factores
que influencian la esporulación y la conservación de
esporas de *P. roqueforti***

Por F. Rejas García

La preparación de esporas de *P. roqueforti* para su utilización en la maduración de los quesos de pasta azul, se realiza en la actualidad de forma empírica en la mayoría de los casos, y aun en los laboratorios que trabajan con cepas puras las técnicas utilizadas son las comunes para el manejo de hongos, sin tener en cuenta si son idóneas o no para este microorganismo.

Conocedores nosotros de la gran influencia que numerosos factores tienen en la esporulación de diversas especies del género *Penicillium*, nos decidimos a investigar la respuesta del *P. roqueforti* frente a varios de ellos, con el objeto de encontrar una técnica más idónea y económica en la producción de esporas destinadas a la maduración de quesos azules.

Los resultados encontrados serán motivo de esta publicación. En el desarrollo de la misma realizaremos primeramente una revisión histórica del problema, para terminar con la exposición y discusión de nuestros resultados experimentales.

REVISION HISTORICA

Desde tiempo inmemorial la producción de esporas del *P. roqueforti* se ha realzado de forma totalmente empírica. Enmohecimiento de panes de harina de trigo y cebada en cuevas húmedas, desecación y trituración posterior de la miga enmohecida, y empleo de la misma en la fabricación de los quesos de pasta azul (Roquefort, en Francia; Gorgonzola, en Italia; Stilton, en Inglaterra; Gammelost, Noruega; Cabrales, España; quesos de pasta azul tipo Roquefort, en todas las naciones).

En 1906, THOM⁸ estudia el papel del *P. roqueforti* en este tipo de quesos, lo aísla y realiza en el mismo un profundo estudio micológico y taxonómico.

Años más tarde, 1913, THOM y CURRIE⁹ investigan su metabolismo y comprueban que puede prosperar en altas concentraciones de cloruro sódico, en medios ácidos, con bajos niveles de oxígeno, y que es productor abundante de enzimas lipolíticos y proteolíticos.

Investigadores del equipo de HAMMER⁴ del Colegio del Estado de Iowa, han estudiado ampliamente el desarrollo del sabor en este tipo de quesos, y el papel que juega en el mismo el *P. roqueforti*.

Más modernamente MEYERS y KNIGHT⁶ han realizado estudios sobre mantenimiento de cepas y nutrición de *P. roqueforti*. CARMICHAEL² sobre resistencia a temperatura de -20°, en relación a la conservación, y BONNER y FERCUS¹ sobre influencia de la temperatura y humedad en el crecimiento de diversos hongos, entre ellos Penicillium.

Desde el punto de vista de la práctica, son interesantes los estudios de CHARRET, LIDOVE y ESCASSUT⁴, sobre esporulación y preparación de esporas de *P. roqueforti* en lactosuero con harina, para su utilización en quesería, así como sus observaciones sobre la frecuencia de contaminantes, generalmente del género mucor, en los inóculos deshidratados del comercio.

PARTE EXPERIMENTAL

TECNICAS UTILIZADAS

El estudio micológico del *P. roqueforti* se ha realizado sobre Agar Czapek Difco, en placa, con incubación a 25° y 50 por 100 de humedad relativa.

En los ensayos de esporulación se ha trabajado con medios de cultivo Difco, excepto en el "Lactosuero harina de trigo", "Arroz", "Cebada", y "Salvado", sobre erlenmeyer de 250 c. c. de capacidad de boca ancha o de 300 c. c. de capacidad boca estrecha, ambos Pirex.

El medio "Lactosuero harina de trigo" se preparó por cocción de una mezcla de suero de leche desaluminizado con un 10 por 100 de harina de trigo, pH del medio 5. Est. 121° 15 m.

El medio "Arroz", esterilizando en matraces el arroz a 121° 30 m. Antes de sembrarlo se le incorporó un 25 por 100 de agua destilada, para humidificar el medio.

El medio "Cebada", esterilizando en matraces la cebada a 121° 30 m. Antes de sembrarlo se le incorporó un 25 por 100 de agua destilada.

El medio "Salvado" esterilizando en matraces el salvado con un 50 por 100 de agua destilada, a 121° 30 m. Antes de sembrarlo se le incorporó un 30 por 100 de agua destilada.

En todos los medios se trabajó con 20 grs. por matraz, excepto en el medio "Salvado", que a causa de su ligereza y para evitar un volumen demasiado elevado, se trabajó con 10 gramos.

La siembra se realizó con un c. c. de suspensión de esporas con agua destilada, por matraz. La concentración de esporas en la suspensión fue de un millón por c. c.

La esporulación se realizó en cámaras con atmósfera acondicionada, a temperatura de 25°, y en humedades relativas del 50 por 100 y del 70 por 100 según los casos.

El contaje de esporas, previa suspensión y homogeneización conveniente de las mismas sobre agua destilada, y tras las diluciones necesarias, se determinó en cámara cuentaglobulos por observación microscópica.

La viabilidad de las mismas, por observación microscópica de germinación sobre capa fina de agar Czapek.

Todos los resultados que aparecen en las Tablas I a V, son las medias aritméticas de los obtenidos en 10 matraces.

ESTUDIO MICOLOGICO

La cepa de *P. roqueforti*, con que hemos realizado este estudio, aislada de un queso de Roquefort, presentó sobre Agar Czapek las siguientes características tras un cultivo de diez días, a 25° y 50 por 100 de humedad relativa:

Caracteres macroscópicos: Colonias planas, extendidas, aterciopeladas, margen aracnoideo, de color azul verdoso las zonas con conidios. Reverso incoloro con zona central amarillo pálida.

Caracteres microscópicos: Conidióforos cortos, con paredes recubiertas de pequeños tubérculos. Esporas subglobosas de un tamaño de 5,5-6,5 x 5-5,5 micras.

Estos caracteres corresponden plenamente al *P. roqueforti* Thom (5, 7).

INFLUENCIA DE DIVERSOS FACTORES EN LA ESPORULACION Y CONSERVACION DE ESPORAS DEL *P. ROQUEFORTI*

Al objeto de lograr una esporulación lo más amplia y rápida posible, ensayamos una serie de factores que sabemos influencian la esporulación de diversas especies del género *Penicillium*. Estos factores fueron: substrato nutritivo, pH y humedad del mismo, humedad de la atmósfera de incubación, aireación del substrato, y tiempo de esporulación. El factor temperatura no lo ensayamos por estar reconocida la de 25° como la más idónea para las especies de este género.

Entre los métodos de conservación de esporas para su uso directo en quesería, estudiamos la influencia del tiempo, de la desecación y del frío, a temperaturas de + 5° y — 20° C.

Resultados obtenidos y discusión:

En la Tabla I reflejamos los resultados obtenidos en la esporulación sobre diversos substratos nutritivos. En los medios clásicos de micología destacan por su capacidad de esporulación los Sabouraud dextrosa, Sabouraud maltosa, y Czapek, aunque con cifras muy inferiores a los medios "Salvado", "Arroz" y "Lactosuero harina de trigo". Entre estos últimos sobresale ampliamente el medio "Salvado".

El medio "Arroz" a pesar de su alta producción de esporas, presenta el inconveniente de una fuerte variabilidad en dependencia de la

TABLA I.—INFLUENCIA DEL SUBSTRATO NUTRITIVO EN LA ESPORULACION.

	grs. medio / cm ² superficie	Millones esporas/ gramo de medio
Sabouraud dextrosa agar	0,5	185
Sabouraud maltosa agar	0,5	505
Patata dextrosa agar	0,5	85
Czapek agar	0,5	260
Corn meal agar	0,5	9,5
Corn meal dextrosa agar	0,5	25
Lactosuero harina de trigo	0,5	365
Arroz	0,5	805
Cebada	0,5	115
Salvado	0,25	3.810

6 días de esporulación, 50 por 100 humedad relativa.

TABLA II.—INFLUENCIA DEL pH, HUMEDAD DEL SUBSTRATO Y HUMEDAD DEL AMBIENTE.

N.º	Adición D. E. c. c. agua dest. a pH 5 con ác-lác	Adición D. E. c. c. agua dest.	Mnes. esp. / gr. salvado	
			50 % HR	70 % HR
1	3	—	3.480	4.160
2	5	—	4.520	5.120
3	7	—	5.160	5.420
4	9	—	5.580	5.720
5	—	3	3.520	4.220
6	—	5	4.500	4.850
7	—	7	5.200	5.460
8	—	9	5.680	5.800

* 6 días de esporulación.

TABLA III.—INFLUENCIA DEL TIEMPO DE ESPORULACION.

<i>Millones de esporas por gramo de medio</i>				
4. ^o día	5. ^o día	6. ^o día	7. ^o día	8. ^o día
1.200	2.340	3.760	3.270	3.810
50 por 100 H R				

TABLA IV.—INFLUENCIA DE LA AIREACION.

<i>Millones de esporas por gramo de medio</i>				
Matraz relación boca/fondo 0,6	Matraz relación boca/fondo 0,31			
Tapón algodón	Filtro leche	Tapón algodón	Filtro leche	
3.760	5.420	3.840	4.760	
50 por 100 H. R.				

TABLA V.—INFLUENCIA DE LOS METODOS DE CONSERVACION.

Método de conservación	Temperatura	% Viabilidad		
Sin desecar	+ 5°	98	98	94
	- 20°	45	42	40
Desecadas	+ 5°	89	92	90
				88

mayor o menor formación de engrudo con la adición de agua después de la esterilización.

En vista de estos resultados nos decidimos a proseguir el resto del estudio con el medio "Salvado", a causa de su bajo precio, alta capacidad de esporulación, fácil manejo y escasa variabilidad.

En la Tabla II exponemos los resultados obtenidos en el estudio de la influencia del pH, humedad del substrato, y humedad del ambiente en la esporulación. El pH del medio, entre 5 y 7, no influencia en absoluto la capacidad de esporulación. Por el contrario, la humedad del ambiente y del substrato la influencian notablemente, aumentando la esporulación a medida que aumentan aquéllas. Por las cifras obtenidas es posible que el óptimo se encuentre próximo a las más altas humedades ensayadas.

En la Tabla III podemos comprobar la influencia del tiempo de esporulación. La cifra de esporas aumenta el sexto día de incubación, permaneciendo inalterable posteriormente.

Finalmente en la Tabla IV se refleja de una forma inequívoca la fuerte influencia de la aireación del substrato en su capacidad de esporulación. El hecho de que las diferencias más notables se manifiesten no en la relación boca/fondo del matraz, sino en el tipo de tapón, indican la importancia que tiene en la capacidad de esporulación el lograr una buena renovación de la atmósfera que circunda el substrato.

La influencia del método y tiempo de conservación en la viabilidad de las esporas, la estudiamos sin desecación con conservación a temperaturas de 5° y -20°, y previa desecación, al vacío y mediante el empleo de Carbagel, con conservación solamente a + 5°. La Tabla V pone de manifiesto la excelente conservación conseguida por desecación y conservación a 5°. La conservación a + 5° sin desecación previa, preserva la vitalidad solamente durante un breve espacio de tiempo. La conservación a - 20°, sin desecación previa, tras una fuerte destrucción durante la congelación, mantiene la viabilidad durante largos períodos de tiempo.

RESUMEN

Se ha realizado un estudio sobre algunos factores que influyen en la capacidad de esporulación y conservación del *P. roqueforti*, con vistas a la producción industrial de esporas para la maduración de quesos de pasta azul.

En la esporulación se ha comprobado la influencia del substrato nutritivo, pH y humedad del mismo, humedad de la atmósfera de incubación, aireación del substrato y tiempo de esporulación, observándose la máxima capacidad de esporulación en el substrato de salvado de trigo, con una fuerte humedad del mismo y de la atmósfera de incubación, con gran aireación del substrato y en un tiempo máximo de seis días. El pH del substrato, entre niveles de 5 - 7, no afecta a la esporulación.

En la conservación de las esporas producidas se ha estudiado la influencia de la desecación, las temperaturas, + 5° y —20°, de almacenamiento, conjuntamente con el tiempo, comprobándose que las máximas viabilidades se consiguen con la desecación y conservación a + 5°.

RESUME

On a fait une étude sur quelques facteurs qui influent sur le pouvoir de sporulation et de conservation du *P. roqueforti* pour la production industrielle de spores pour la maturation des fromages à pâte bleue.

Dans la sporulation on a déterminé l'influence du substrat nutritif, le pH et l'humidité de celui-ci, l'humidité du milieu d'incubation, l'aération du substrat et le temps de sporulation, et on a observé le pouvoir de sporulation maximum dans le substrat de son de blé, avec une grande humidité de celui-ci et du milieu d'incubation, et une grande aération du substrat, dans un temps maximum de 6 jours. Le pH du substrat entre 5-7 n'affecte pas la sporulation.

Dans la conservation des spores produites on a étudié l'influence de la déshydratation, de la température de magasinage à + 5° C et —20° C, ainsi que celle du temps, et on a observé que les viabilités maximum s'obtiennent avec la déshydratation et la conservation à + 5° C.

SUMMARY

A study on some factors influencing the capacity of sporulation and preservation of *P. roqueforti* has been carried out concerning the industrial production of spores for maturity of blue-paste cheese.

In the sporulation, the influence of nutrient substrate, its pH,

moisture and aeration, the moisture of incubation environment, and the time of sporulation have been determined and we have observed the maximum capacity of sporulation, the high moisture of wheat bran substrate, the high moisture of incubation environment and the high aeration of the substrate; all this in a maximum time of 6 days. The pH of the substrate ranging between 5-7 does not affect the sporulation.

Concerning the preservation of the spores produced we have studied the influence of dehydration, that of storing temperature at + 5° C and at —20° C, and that of time, and we have observed that the maximum viabilities are obtained with the hydration and preservation at + 5° C.

BIBLIOGRAFIA

1. BONNER, R. D., y FERGUS, (1960).—Mycologia, 52, 643.
2. CARMICHAEL, J. W. (1962).—Mycologia, 54, 432.
3. CHARRET, J., LIDOVE, P., y ESCASSUT (1955).—L'Industrie laitiere, 102, 57.
4. HAMMER, B. W., y BRYANT, H. W. (1937).—Iowa State Col. Jour. Sci., 11, 281.
5. LOUSTAN, J. (1950).—Clave determinativa de las especies del género *Penicillium*. Publicaciones de la Universidad de Murcia.
6. MEYERS, E., y KNIGHT, (1959).—Applied Microbiol., 6, 174.
7. RAPER, K. B., THOM, CH., y FENNEL, D. I. (1949).—A manual of the *Penicillia*, Williams - Wilkins. Baltimore.
8. THOM, CH. (1906).—U. S. Dept. Agr. Buz. Anim. Ind., Bull. 82, 1.
9. THOM, CH., y CURRIE, J. N. (1913).—Jour. Biol. Chem., 15, 249.