

MADURACION DEL QUESO «CABRALES» MICROFLORA: II.—Mohos.

*por Fco. J. Sala,
J. Burgos y
J. A. Ordóñez.*

La participación de los mohos en la maduración de algunas variedades de queso como las del tipo «Roquefort», «Gorgonzola», «Stilton» y otras, les confiere unas características fácilmente diferenciables de aquellas variedades en las que no participan estos microorganismos.

Las características organolépticas del queso «Cabrales» recuerdan bastante a las de los quesos denominados «de vena azul», por lo que es lógico suponer que los mohos tengan una participación importante en su proceso madurativo.

En el presente trabajo se describe el aislamiento e identificación en este queso de diversas especies de mohos y se discute el probable significado de los mismos.

MATERIAL Y METODOS

Los reactivos utilizados en la preparación de los medios de cultivo para el aislamiento e identificación de estas especies fueron suministrados por la casa Difco.

Para el aislamiento de las cepas de mohos presentes en el queso, se utilizaron cuatro muestras de queso maduro procedentes de cuatro de las más acreditadas cuevas de la zona de Cabrales y se procedió como se indica a continuación.

Aislamiento de cepas: Se trituró una muestra de cada queso en citrato sódico al 2 % y de esta suspensión se efectuaron diluciones 1/10 en agua destilada estéril. Se efectuaron siembras de cada una de estas diluciones en placas de Petri con agar patata-glucosa-acidificado.¹

La observación de las cepas al microscopio se realizó en cultivos en portaobjetos.

El aspecto macroscópico de los cultivos se observó sembrando en medios de cultivo de agar patata-glucosa-acidificado, agar malta y agar Czapek.

La identificación de las especies de *Penicillium* se efectuó de acuerdo con las normas de RAPER y THOM² y la de *Mucor* con las de JÖRGENSEN y HANSEN³ y SMITH.⁴

RESULTADOS

Penicillium: Se aislaron 15 colonias de *Penicillium* diferenciables entre sí por su color, forma de crecimiento, etc., que parecían pertenecer a especies diferentes. La observación repetida de sus caracteres culturales y morfológicos a lo largo de las múltiples resiembras delató la persistencia de estas diferencias entre las distintas cepas si bien éstas no eran en muchos casos tajantes: así, atendiendo al color producido en el reverso de los cultivos de agar patata, se obtuvo toda la gama de tonalidades desde la no coloración, pasando por diversos tonos verdosos y amarillentos hasta una coloración casi marrón. Lo propio ocurría al considerar otras características como el olor de los cultivos, que variaba desde el suave aroma a cítrico, pasando por el olor a seta u olor picante a moho característico del queso de «Roquefort», hasta un olor intensísimo a tierra mojada.

La identificación de especies entre otros microorganismos se realiza con bastante facilidad, pero es particularmente difícil en los mohos que tienen una enorme capacidad de adaptación a ambientes muy distintos, lo que da lugar a una gran variabilidad intraespecífica, en especial en el género *Penicillium* en el que la taxonomía de algunas de las especies más comunes se halla tan confusa que es frecuente encontrar descritas en la literatura con rango de especies, varias cepas de un mismo *Penicillium*.

Considerando estos hechos y la escasa significación de algunos caracteres propios de algunas de las cepas, como por ejemplo la persistencia de un intensísimo olor a moho, se agruparon los cultivos que mayor número de características poseían en común y se obtuvo dos lotes claramente dife-

renciados entre sí. Tomóse de cada lote una cepa que se consideró la cepa tipo y se estudió con detalle. Los resultados obtenidos se exponen a continuación.

Cepa A.—Los cultivos de esta cepa en agar patata o agar malta crecían con mayor rapidez que en agar Czapek. La superficie del cultivo era fina y lisa, de aspecto aterciopelado; los bordes eran difusos y de color blanquecino y el resto era de color verde, que se intensificaba con el tiempo pero que en cultivos muy viejos perdía de nuevo su intensidad. El reverso de la colonia adquiría color verde oscuro con el tiempo; el olor de estos cultivos era «a moho», muy semejante al del queso «Roquefort». No se observó la presencia de exudado.

El examen a pequeños aumentos en el microscopio revelaba un entramado de hifas, la mayor parte de las cuales terminaban en penicilios. Abundaban los conidióforos rectos de hasta 500 micras de longitud que emergían directamente de hifas en el interior del agar y eran en la mayoría de los casos biverticilados, existiendo en ambos penicilios, fiálides en forma clásica de botella. A veces los conidióforos se formaban a partir de micelio aéreo. En la mayor parte de los casos no existían métulas o se hallaban éstas escasamente diferenciadas. Cuando el penicilio era biverticilado, el verticilo adyacente crecía paralelamente al verticilo principal. El conidióforo era rugoso en la mayor parte de los casos y de un diámetro de 5 micras (Fig. 2). Las fiálides eran algo más delgadas (7-13 micras de longitud por 3-4 de grosor) y los conidios, de forma globosa, eran lisos, de 3-5 micras de diámetro y ordenados en cadenas, de número variable, por lo general de 5-15 unidades, según la edad del cultivo.

Cepa B.—El crecimiento de esta cepa era también más intenso en agar patata o agar malta que en agar Czapek. La superficie de los cultivos era lisa, fina, de aspecto aterciopelado y carácter expansivo. El color de la misma era verde, algo más oscuro que la cepa A y los bordes del mismo color y algo menos difusos. El reverso de cultivo tomaba color amarillento a medida que progresaba la incubación pero no se observó en el anverso exudado alguno. El cultivo olía «a moho» con bastante intensidad. El examen al microscopio a pequeños aumentos reveló la existencia de micelio reproductivo de 250-300 micras de longitud y de 3-5 micras de diámetro, generalmente ramificado, dando lugar a penicilios asimétricos monoverticilados en los que no se observaban por lo general métulas bien diferenciadas. Los conidióforos eran lisos en su inmensa mayoría y los conidios, de forma subglobosa-elipsoidal, de 3-5 micras de diámetro, formaban largas cadenas

de hasta 50 unidades que aunque permanecían más o menos estiradas, frecuentemente se asociaban en grupos proporcionando al cultivo un aspecto característico (Fig. 3 y 4). En la misma preparación aparecían conidióforos mucho más largos con ramificaciones laterales pero en mucha menos proporción.

Mucor: Se aislaron también de dos de las cuevas cuatro colonias de moho de aspecto algodonoso. En el transcurso de la identificación fueron eliminadas tres de las colonias al comprobar que eran idénticas y la colonia restante fue analizada detalladamente.

Cepa C.—Las colonias de este moho, en medio de cultivo de agar patata-glucosa-acidificado, son de crecimiento exuberante y toman en un principio color claro que con el tiempo se vuelve pardo.

En el examen de estos cultivos al microscopio se comprobó la existencia de esporangióforos de 100-200 micras de diámetro, de color oscuro, y cuya superficie estaba cubierta de pequeños cristales (Fig. C-b). En ocasiones los esporangióforos están ramificados y las ramificaciones ostentan esporangios más pequeños (Fig. C-a).

Cuando los esporangios están maduros se rompen y liberan esporas alargadas de unas 10 micras de longitud y 3-5 micras de grosor.

DISCUSION

Penicillium.

Cepa A.—La longitud y diámetro de los conidióforos, el aspecto rugoso de su superficie y el carácter asimétrico de los penicilios, así como el número, tamaño y forma de los conidios y la morfología del micelio en general, es típica de la especie *Penicillium roqueforti*. También las características culturales de nuestra cepa: aspecto aterciopelado de la superficie de estos cultivos, el crecimiento de carácter expansivo con los bordes de las colonias de color claro y el reverso de las mismas de color verde oscuro son características culturales típicas de esta especie, a la que recuerda incluso el olor de nuestra cepa.

Por otra parte no existe ni dentro del grupo velutina, ni entre los pertenecientes a los grupos lanata, funiculosa o fasciculata, ninguna especie que pueda considerarse semejante, por lo que se trata sin duda de una cepa de *P. roqueforti*. Las demás cepas aisladas, que agrupamos junto a ésta, probablemente son variedades con características semejantes que

representan a las descritas como *Penicillium gorgonzola*, *Penicillium stilton*, etc., por diversos autores pero que en la opinión de RAPER y THOM² no poseen suficiente entidad como para ser consideradas ni siquiera variedades dentro de esta especie.

Cepa B.—A pesar de que esta cepa es de identificación menos clara, no cabe duda que pertenece también al grupo velutina y por la ordenación de sus penicilios, al mismo grupo de *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium oxalicum*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium roqueforti*, y *Penicillium brevicompactum*. Realmente este *Penicillium* resulta semejante a *P. chrysogenum*, tanto por sus características culturales como por su morfología: la longitud de sus conidióforos y de sus cadenas de conidios son características todas ellas típicas en *P. chrysogenum*. Sin embargo nuestra cepa desprende cierto olor a moho que no es frecuente en esta especie y no observamos en cambio zonas de crecimiento en el cultivo, como es corriente en *P. chrysogenum*. Las divergencias con la cepa tipo, sin embargo, no son demasiado importantes ya que son caracteres intraespecíficamente muy variables y dependen además de exactas condiciones culturales.

Se diferencia claramente de *P. roqueforti* tanto en el tamaño de sus conidióforos como por la ordenación del penicilio y forma y número de esporas.

De *P. oxalicum* se distingue por sus características culturales y si bien su observación al microscopio recuerda en cierto modo la morfología de esta especie por el tamaño de los penicilios y número de fiálides y conidios, sin embargo éstos son claramente elípticos y no existe la ordenación típica de las cadenas de esporas que caracterizan a *P. chrysogenum*.

Por otra parte es evidente que no se trata de *P. digitatum* que es con seguridad la especie morfológicamente más diferenciable del grupo, ni de *P. brevicompactum* que posee unos penicilios muy poblados de base muy corta y largas cadenas de conidios.

En resumen pues, aunque hay leves diferencias que apartan a nuestra cepa de la cepa tipo de *P. chrysogenum*, las atribuimos a variaciones intraespecíficas.

Mucor.

Cepa C.—Esta cepa de moho de aspecto algodonoso y color pardo se identificó fácilmente como perteneciente al género *Mucor* por la ausencia de raíces, conformación de los esporangióforos y esporangios y demás

características. La longitud de los esporangióforos, la presencia y tipo de ramificaciones y el tamaño color y forma de los esporangios, la forma de las esporas y la columela parecen indicar que se trata de *M. mucedo*.

Si bien nuestra cepa guarda también cierta semejanza con *M. plumbeus* cuyo esporangio suele también estar recubierto de finas agujas cristalinas, el color del cultivo de este moho es azul plomizo mientras que el de nuestra cepa es pardo. Además los esporangióforos son en nuestra cepa mucho más largos, no hemos observado las clásicas formaciones espinosas en el vértice de la columela y las esporas son esféricas.

Por todos estos hechos identificamos a esta cepa como *M. mucedo*.

El «bouquet» del queso «Cabrales» ofrece ciertas semejanzas con el grupo de quesos «de vena azul» pero presenta características propias que permiten diferenciarlo netamente de cualquier otra variedad.

Parece lógico suponer que en su típico e intenso sabor participen como en las variedades más afines los ácidos grasos libres y las metil-cetonas producidas en la degradación de las grasas por los penicilios (5, 6, 7, 8). En este sentido debe considerarse como un hecho esperado la identificación de *P. roqueforti*, especie muy frecuente en los quesos «de vena azul»; es más sorprendente en cambio la presencia de *P. chrysogenum* que no ha sido hasta el momento descrita en estos productos.

La participación de *P. roqueforti* en la maduración de estos quesos no parece que pueda ponerse en duda si se tienen en cuenta las características del mismo y el papel desempeñado por *P. roqueforti* en la maduración de los quesos «Gorgonzola», «Stilton» y otras variedades.

Las diferencias observadas entre las colonias originalmente aisladas, parecen indicar que en la maduración del queso «Cabrales» participan varias cepas de esta especie y aunque las leves diferencias morfológicas no justifiquen la consideración de las mismas como especies distintas probablemente ofrecen diferencias metabólicas importantes.

El significado que pueda tener la presencia de *P. chrysogenum* es más oscuro; en primer lugar sólo ha sido aislado de los quesos procedentes de dos de las cuevas y en segundo lugar se carece de datos relativos a transformaciones metabólicas producidas por el mismo en un sistema similar al queso.

La presencia en proporción apreciable de *Mucor mucedo* en las muestras de dos de las cuevas estudiadas resulta interesante. Los quesos de estas cuevas se distinguían por su sabor característico, claramente diferenciable del de los quesos fabricados en las cuevas donde sólo fueron hallados pe-

nicilios y parece razonable suponer que su presencia es accidental y probablemente resulta en detrimento del «aroma» típico.

En cualquier caso, las variaciones observadas en la flora fúngica de estos quesos resulta muy significativa: explica en parte las diferencias organolépticas y confirma la heterogeneidad de estos productos.

RESUMEN

Se ha investigado la flora del queso español «Cabrales», de maduración desconocida.

El presente trabajo describe el aislamiento e identificación de *Penicillium roqueforti*, *Penicillium chrysogenum* y *Mucor mucedo*.

RESUME

On a fait des recherches sur la flore du fromage espagnol «Cabrales» dont la maturation est inconnue.

Ce travail décrit l'isolement et l'identification de *Penicillium roqueforti*, *Penicillium chrysogenum* et *Mucor mucedo*.

SUMMARY

A study has been carried-out on the microbial flora of the spanish cheese «Cabrales» of unknown ripening process.

This paper describes the isolation and identification of the moulds *Penicillium roqueforti*, *Penicillium chrysogenum* and *Mucor mucedo*.

Also some species of yeasts and lactic bacteria have been identified but this, together with the results of other investigations are the subject of other publications.

BIBLIOGRAFIA

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Normas para el análisis de productos lácteos*. W. H. O. Washington. (1963). p. 58-96.
2. RAPER K. and THOM CH. *A Manual of the Penicillia*. Williams & Wilkins Co. Baltimore. (1949). p 394-395.
3. JÖRGENSEN A. y HANSEN A. «*Microbiología de las Fermentaciones. Industriales*». Acribia. Zaragoza. (1959). p. 208-210.
4. SMITH C. «*Introducción a la Micología Industrial*». E. Acribia. Zaragoza. (1963). p. 49-56.
5. HAMMER B. W. BRYANT H. W. (1937). A flavor constituent of blue cheese (Roquefort type). Iowa State Coll. *J. Sci.* **11**, 281.
6. SJÖSTRÖM G. and MALM B. (1952). Cultivation and curdling experiments with «*Penicillium roqueforti*». *Svenska Mejeritidn.* **44**, 81.
7. BERRIDGE N. J. (1953). The antibiotic nisin and its use in the making and processing of cheese. *Chem. and Ind.* (London) 1158.
8. TSUGO T. and MATSUOKA H. (1962). The formation of volatile sulphur compounds during the ripening of the semi-soft white mould cheese. *16th Intern. Dairy Congr.* Copenhagen B, 385.



Figura 1.—Cepa A: Cultivo en agar malta (70X)

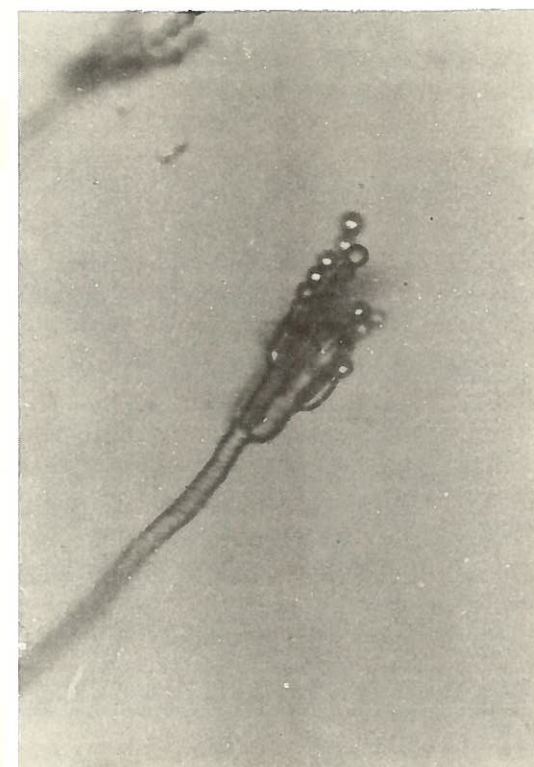


Figura 2.—Cepa A : Aspecto típico de un penicilio. (600X).



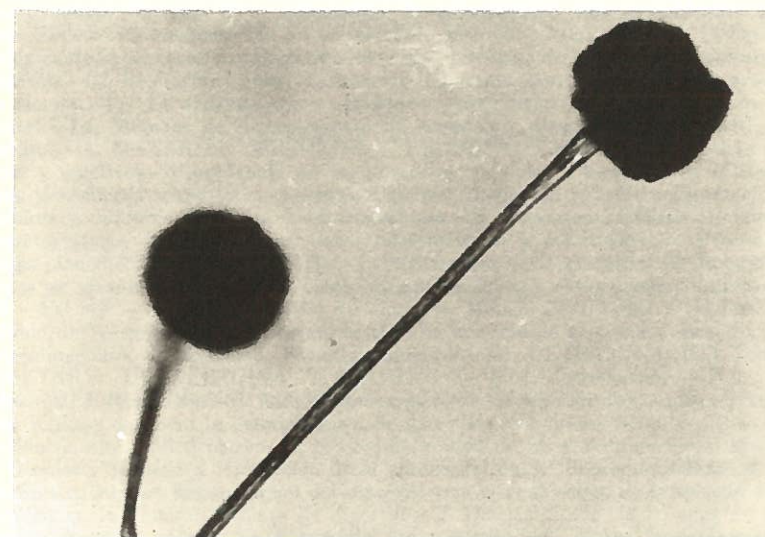
Figura 3.—Cepa B : Aspecto de un cultivo en agar malta. (55X).



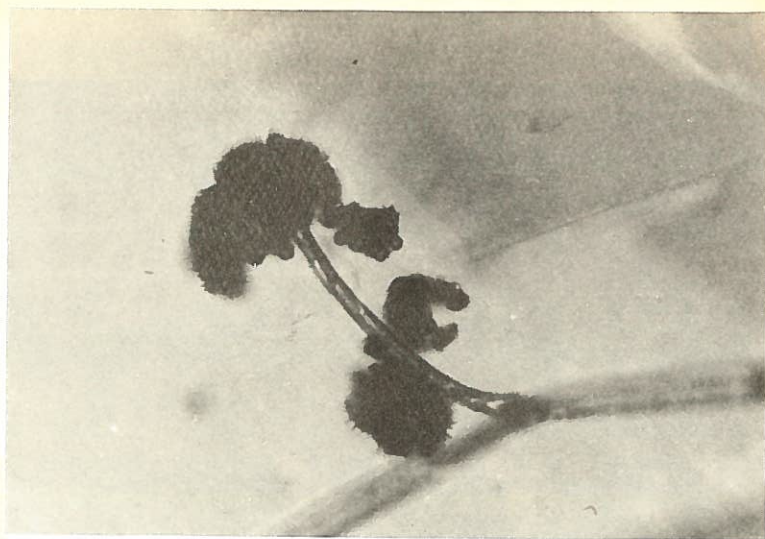
Figura 4.—Cepa B : Aspecto típico de un penicilio. (225 X).



Figura 5.—Cepa C: a) Cultivo en agar malta (15 X),



b) Esporangios (150 X)



c) Detalle de un esporangio (200 X).