



**ESCUELA DE INGENIERÍAS AGRARIAS
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL Y
CIENCIA DE LOS ALIMENTOS**

**CARACTERIZACIÓN DEL CARDO (*Cynara
cardunculus*, L) PARA SU USO COMO CUAJO
VEGETAL EN EL PROCESO DE ELABORACIÓN
DE LA TORTA DEL CASAR**

**Memoria que presenta la Ingeniera
Dña. Elena Ordiales Rey
para obtener el Título de Doctor
Badajoz, Julio de 2012**

Escuela de Ingenierías Agrarias

Ciencia y Tecnología de los Alimentos

**DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN
ANIMAL Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS**

**Ctra Cáceres s/n
06071- BADAJOZ
Teléfono: 924286200
Fax: 924286201**

María de Guía Córdoba Ramos, Profesora Titular del Área de Nutrición y Bromatología del Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Extremadura

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada “Caracterización del cardo (*Cynara cardunculus*, L) para su uso como cuajo vegetal en el proceso de elaboración de la Torta del Casar” presentado por Doña Elena Ordiales Rey ha sido realizada bajo mi dirección en el Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Extremadura y cumple las condiciones exigidas para optar al Título de Doctor.

Lo que firma en Badajoz a Lunes, 2 de julio de 2012.

Fdo: María de Guía Córdoba Ramos

Escuela de Ingenierías Agrarias

Ciencia y Tecnología de los Alimentos

**DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN
ANIMAL Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS**

Ctra Cáceres s/n
06071- BADAJOZ
Teléfono: 924286200
Fax: 924286201

Alberto Martín González, Profesor Titular del Área de Nutrición y Bromatología del Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Extremadura

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada “Caracterización del cardo (*Cynara cardunculus*, L) para su uso como cuajo vegetal en el proceso de elaboración de la Torta del Casar” presentada por Doña Elena Ordiales Rey ha sido realizada bajo mi dirección en el Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Extremadura y cumple las condiciones exigidas para optar al Título de Doctor.

Lo que firma en Badajoz a Lunes, 2 de julio de 2012.

Fdo: Alberto Martín González

Escuela de Ingenierías Agrarias

Ciencia y Tecnología de los Alimentos

**DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN
ANIMAL Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS**

Ctra Cáceres s/n
06071- BADAJOZ
Teléfono: 924286200
Fax: 924286201

María José Benito Bernáldez, Profesora Titular del Área de Nutrición y Bromatología del Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Extremadura

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada “Caracterización del cardo (*Cynara cardunculus*, L) para su uso como cuajo vegetal en el proceso de elaboración de la Torta del Casar” presentada por Doña Elena Ordiales Rey ha sido realizada bajo mi dirección en el Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Extremadura y cumple las condiciones exigidas para optar al Título de Doctor.

Lo que firma en Badajoz a Lunes, 2 de julio de 2012.

Fdo: María José Benito Bernáldez

Agradecimientos

Tras haber recorrido el camino que tiene su primer parada en la defensa de mi trabajo de tesis, y con el que he satisfecho las inquietudes y motivaciones que me llevaron a emprenderlo, pongo el conocimiento generado y recogido en esta tesis a disposición del sector quesero de Extremadura, en especial a aquellos que se dedican a elaborar la "Torta del Casar", por si resulta útil para mejorar su conocimiento sobre el cuajo y su procedencia, su manejo y la influencia que ejerce en el producto final. Aprovecho para, desde aquí, despertar la consciencia en los productores, que deben proteger el patrimonio natural que constituye el cardo en Extremadura, ya que es un ingrediente fundamental para ellos, y ellos deben ser los más interesados en conservarlo y controlarlo.

Esta es mi pequeña y humilde contribución a un producto que está llevando el nombre de mi pueblo por todo el mundo.

A todas las personas que me han ayudado a llevar a cabo este trabajo de Tesis Doctoral:

A mis directores de tesis, Prof. Dr. Alberto Martín, Prof. Dra. M^a José Benito y Prof. Dra. M^a de Guía Córdoba, por vuestra disponibilidad, por vuestra generosidad, por adaptaros a mi horario, por vuestro tiempo, por todo lo que he aprendido con vosotros, por el apoyo, por ayudarme en todo y más de lo que he necesitado en todo este tiempo, por todo lo que me habéis aportado a nivel profesional y personal.

Al resto de miembros del grupo de investigación CAMIALI, Prof. Dr. Alejandro Hernández, Prof. Dr. Emilio Aranda, Prof. Dr. Francisco Pérez, por vuestro apoyo y asesoramiento, por vuestra disponibilidad, simpatía y amabilidad en todo momento.

Al Dr. Santiago Ruíz - Moyano, por todas las horas de laboratorio desde que empezamos con la beca de colaboración, por venir a trabajar en fin de semana para ayudarme a hacer los quesos, por traerme cuajo de su tierra, por la búsqueda de artículos en Davis, por su apoyo incondicional incluso desde California, por sus palabras de ánimo, por entenderme, por ser mi amigo.

A todos los compañeros con los que he compartido horas y horas en el laboratorio, protocolos, reactivos, material, etc. desde que empecé este proyecto, muchos de ellos ya Doctores o a punto de serlo, Dr. Julio, Vita, Guti, Alejandro, Dra. Rocío, Marga, M^a José, Nieves, Malu y el resto de compañeros, en especial al Dr. Manuel Serradilla, que es el mejor reviewer y a la Dra. Alicia Rodríguez, por nuestra amistad.

A Mariano Cabrero porque siempre creyó en mí y en mi proyecto, por su interés y su amabilidad, por sus ánimos y por la energía positiva que me transmite.

A Cándido Cebrián, allí donde esté, por ponerme en marcha la planta piloto y evitarme tener que leer las instrucciones de los aparatos, y porque nunca me regañó aunque le quedara muchas cosas para fregar.

A M^a de Guía, por la confianza que depositó en mí desde el principio para poner en marcha este proyecto y porque gracias a ti se ha convertido en realidad, por el tiempo que me has

dedicado aún cuando no tenías tiempo, por no dejar que me conforme ni me rinda, por las palabras de ánimo de cada día, por enseñarme a ser mejor profesional y por la confianza a nivel personal.

A la DOP Torta del Casar, y en especial al Director Técnico, Javier Muñoz, por su colaboración en la ejecución de este trabajo, por enseñarnos a elaborar el producto y por hacernos llegar los problemas del sector. Por los datos proporcionados sobre producción, certificación, etc.

A los maestros queseros de Torta del Casar, Jesús Moreno, Diego Lindo y David Franco, por aguantar mis entrevistas, contarme los trucos, prestarme moldes, y estar siempre dispuestos a ayudarme.

A la DOP Queso de la Serena por facilitarme los datos de producción e invitarme a sus queserías.

A Arturo por confiar en que no le iba a quitar el negocio y enseñarme las localizaciones donde recoge el cardo.

Al Prof. Dr. Abelardo García, por creer en mí, por enseñarme que la tesis sería una carrera de obstáculos, por las recogidas de cardo en el campo, por los consejos, por estar siempre ahí.

*Al Dr. Jerónimo González, de la Finca La Orden-Valdesequera, por prestarme su ayuda y por las muestras de *Cynara cardunculus* que recogimos de su plantación.*

A Juan Labrador, Raúl Labrador y Arturo Hernández por acompañarme a buscar los cardos en el campo.

A mis compañeros de CTAEX, Patricia, Abel, Raquel, Isa, Rosa y Carmen, que me han ayudado con algunos análisis de laboratorio. A mis compañeros del área de Agricultura de CTAEX, y Aurori y Ángela, por todo lo que me han enseñado estos años, por su cariño, por su apoyo, y por nuestros desayunos.

A mis amigos, porque siempre estáis cuando os necesito, por vuestras muestras de cariño, apoyo y comprensión, por alegraros de mis triunfos y acompañarme en mis derrotas. En especial a Verónica por sus correcciones y consejos.

A toda mi familia, por estar en los buenos y malos momentos, por todos los ratos que compartimos, por todo lo que he aprendido de cada uno de vosotros, por el camino que nos queda recorrer juntos, en especial a mi abuela Brígida.

A mis padres, Juan y Maxi, y mis hermanos, Juan Antonio y Prado, por vuestro apoyo y entusiasmo con este proyecto, por ser mi fuente de inspiración, por recargarme las pilas, por ayudarme a levantar cada vez que caigo, por escucharme, por dejarme elegir, por corregirme cuando me equivoco, por enseñarme que nunca me iban a regalar nada en la vida, por ser mi refugio.

*Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor,
la electricidad y la energía atómica, la voluntad.*

Albert Einstein

A Juan, Maxi, Juan Antonio y Prado

I.-INTRODUCCIÓN

I.1. EL QUESO

I.1.1. Definición de queso

Según el Codex Alimentario, se entiende por queso el producto blando, semiduro, duro y extra duro, madurado o no madurado, y que puede estar recubierto, en el que la proporción entre las proteínas del suero y la caseína no sea superior a la de la leche, obtenido mediante:

a) Coagulación total o parcial de la proteína de la leche, leche desnatada/descremada, leche parcialmente desnatada/descremada, nata (crema) de suero o leche de mantequilla/manteca o de cualquier combinación de estos materiales por acción de cuajo u otros coagulantes idóneos, y por escurrimiento parcial del suero que se desprende como consecuencia de dicha coagulación, respetando el principio de que la elaboración del que resulta en una concentración de proteína del queso que deberá ser evidentemente más alto que el de la mezcla de los materiales lácteos ya mencionados, en base a la cual se elaboró el queso y/o

b) Técnicas de elaboración que comportan la coagulación de la proteína de la leche y/o de productos obtenidos de la leche que dan un producto final que posee las mismas características físicas, químicas y organolépticas que el producto definido en el apartado a).

I.1.2. Producción de queso a nivel mundial, nacional y regional

La producción de queso en el mundo ha aumentado un 76,3 % en los últimos 30 años, hasta 19,1 millones de t en 2008. Estados Unidos es el mayor productor de queso a nivel mundial, produciendo más de 4,8 millones de t en 2008, lo que supone un 39,7 % de la producción mundial. En Europa, Alemania y Francia son los países que más cantidad de queso produjeron, con 1995 miles de t y 1812 miles de t, respectivamente en 2008, según datos de la FAO (2008).

En España se produjeron 312900 t de queso, en 2009, según los datos del MARM. En función del origen de la leche, un 13,7 % del queso producido fue puro de oveja, frente al 39,5 % de vaca, el 6,7 % de cabra, y un 40,1 % de mezcla de los distintos tipos de leche. Atendiendo a las categorías de queso, un 20 % de los quesos era de pasta blanda y semiblanda, un 35 % de pasta semidura y dura y un 41 % de queso fresco.

Introducción

La DOP Torta del Casar certificó más de 500000 unidades de queso tipo torta en 2010. Desde su constitución la producción de quesos amparados bajo esta marca de calidad ha pasado de 156000 kg de queso en 2002 a 381716 kg de queso en 2010, es decir, la producción se ha duplicado. En este tiempo el n° de ganaderías inscritas a la DOP ha disminuido de 39 a 28, sin embargo, la producción no se ha visto comprometida, dado que estas ganaderías han aumentado su capacidad, con un mayor n° de cabezas inscritas a la DOP. Unido a ello el n° de industrias inscritas a la DOP también ha experimentado un aumento desde 2002, como se observa en la Tabla I.1.

Tabla I.1. Evolución del n° de ganaderías, cabezas e industrias inscritas a la DOP Torta del Casar.

	N° ganaderías inscritas	N° cabezas inscritas	N° industrias inscritas
2002	39	19100	8
2003	45	21650	9
2004	51	23600	9
2005	58	25300	12
2006	52	28800	13
2007	50	27650	13
2008	41	26416	13
2009	30	26632	14
2010	28	24656	14

Analizando la evolución de los datos de producción de leche y queso en los últimos diez años, se observa una tendencia al alza desde 2002 hasta 2007, cuando se registraron cifras récord de producción, en términos de litros de leche y kg de queso certificados, así como de n° de ganaderías y n° de cabezas inscritas. A partir del año 2007 se registran valores más estables de producción, en torno a 285 mil litros de leche certificada y 375 mil kg de queso certificados (Figuras I.1 y I.2).

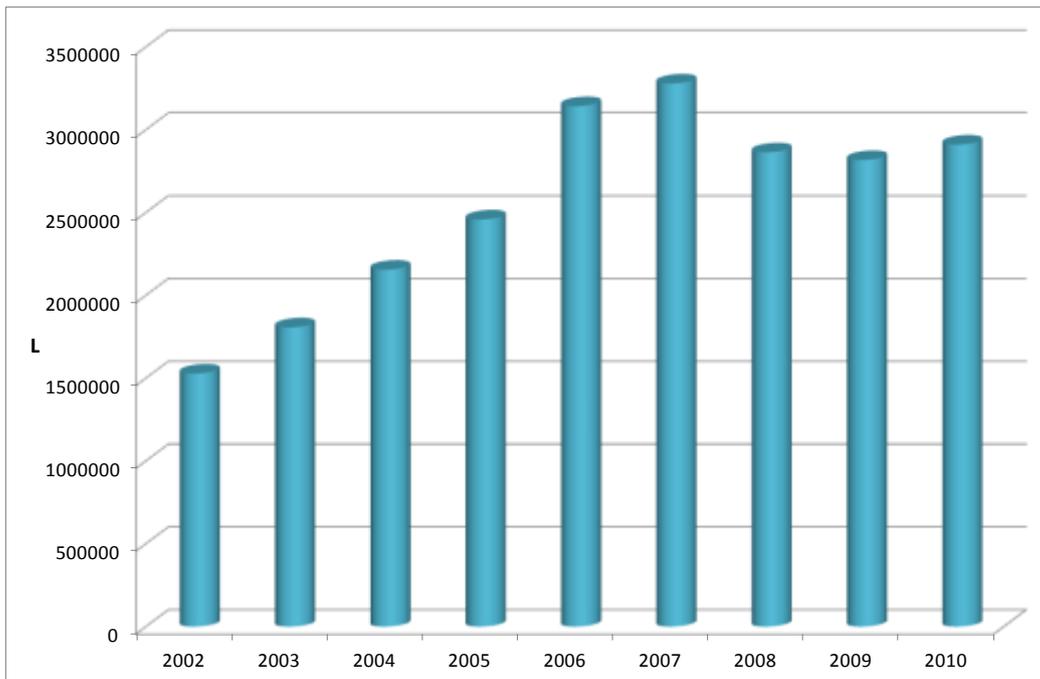


Figura I.1. Cantidad de leche (L) certificada por la DOP Tota del Casar.

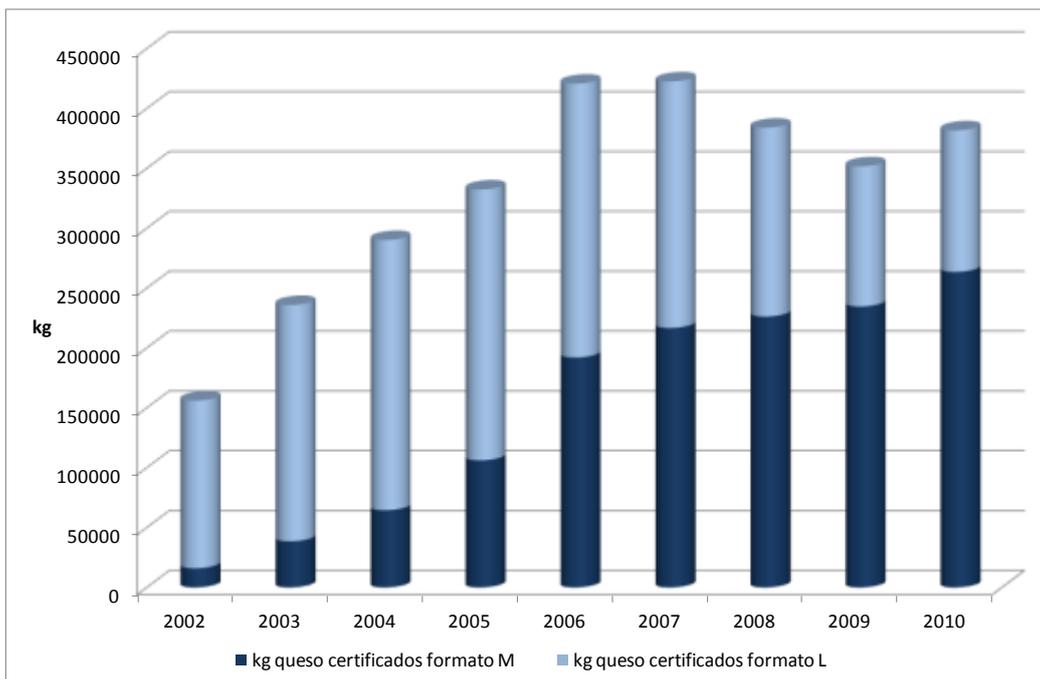


Figura I.2. Cantidad de queso (kg) certificado por la DOP Torta del Casar.

A lo largo de la vida de la DOP Torta del Casar se ha constatado un cambio en el formato tradicional de presentación de la Torta, debido a un cambio en el gusto del consumidor, que demanda productos de menor tamaño, lo cual obligó a los industriales

a fabricar quesos tipo torta de 0,5 kg, en lugar de las piezas de 1 kg. De modo que se observa que la cantidad de queso de 0,5 kg ha ido aumentando en los últimos años, en detrimento de la cantidad de queso de 1 kg de peso (Figura I.2). Desde 2010 la DOP Torta del Casar también certifica piezas de torta de 0,25 kg de peso, para satisfacer las demandas del consumidor.

Tabla I.2. Datos de ventas de quesos, en t de queso, en los ámbitos nacional e internacional.

Ventas (t)	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Nacional	154	212,4	264	301,1	389,5	397,9	369,3	339,1	369,3
Internacional	2	23,6	26,1	31,3	31,2	24,6	14,5	12,6	12,4

Las ventas de Torta del Casar en el ámbito nacional han aumentado de forma progresiva desde 2002 a 2010, alcanzando el máximo en 2007, con 397984 kg de queso vendidos. La evolución de las ventas a nivel internacional difiere de la tendencia al alza del terreno nacional, ya que aumentaron hasta 2005, cuando alcanzaron su mayor valor, pero disminuyen desde entonces de forma progresiva hasta 2010, cuando se destinaron al mercado internacional poco más de 12000 kg de queso Torta del Casar. El 87 % de las ventas internacionales se produjeron en los países europeos en 2006, y un 81 % en 2010. El continente americano absorbió un 12 % de estas ventas en 2006 y un 17 % en 2010. Entre el 1 y 2 % de las ventas internacionales se realizaron a países del resto del mundo. (*Datos proporcionados por la DOP Torta del Casar*).

La DOP “Queso de La Serena” ampara a quesos elaborados a partir de leche cruda de oveja, cuajada con el extracto acuoso obtenido de las flores de *Cynara cardunculus*, en la zona de La Serena, en la provincia de Badajoz. Esta DOP fue creada en 1991 y su reglamento se aprobó el 29 de abril de 1992, goza del carácter de “protegida” desde 1996, y es la DOP más antigua de Extremadura. En la actualidad agrupa a 18 industrias queseras.

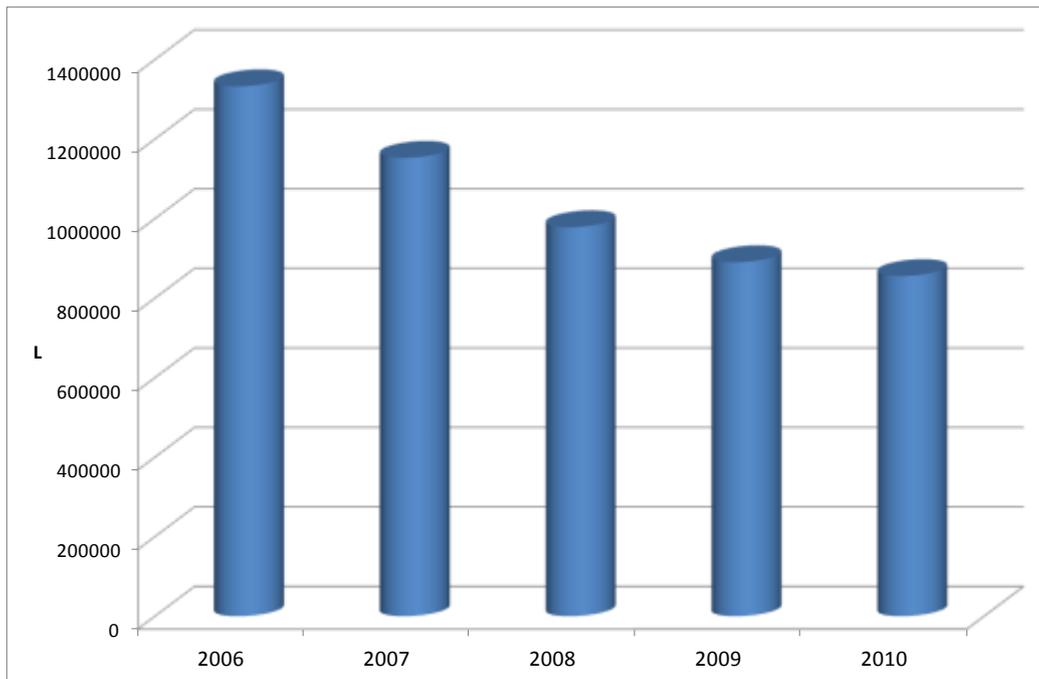


Figura I.3. Producción de leche (L) para la elaboración del “Queso de La Serena” desde 2006.

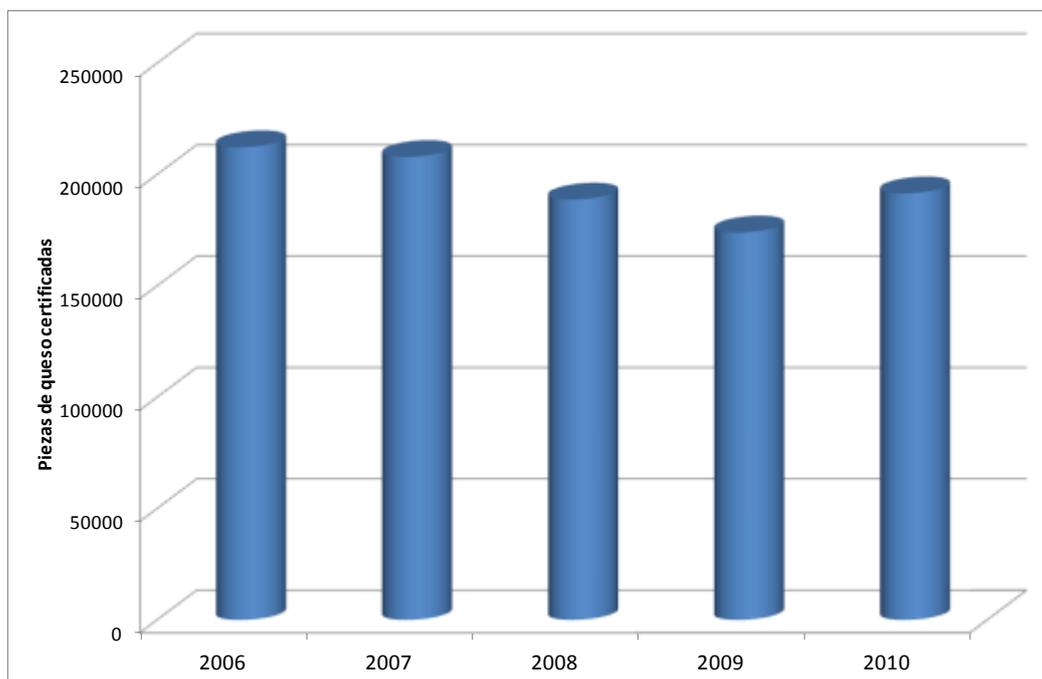


Figura I.4. Piezas de queso certificadas por la DOP “Queso de La Serena” desde 2006.

La producción de leche para la elaboración del “Queso de La Serena” ha ido disminuyendo desde el año 2006, cuando se registró una producción de 1333 miles de L, hasta el año 2010, con apenas 900 mil litros. Por tanto, la cantidad de piezas de queso

certificadas en este tiempo ha seguido la misma tendencia, de forma que en 2006 se certificaron 212 mil piezas, cantidad que se ha ido reduciendo hasta las 192 mil piezas certificadas en 2010. (*Datos proporcionados por la DOP Queso de La Serena*).

I.1.3. Tipos de quesos más importantes

Los quesos elaborados a partir de leche de oveja y de cabra presentan un especial gusto y sabor, muy distintos de los procedentes de leche de vaca. Estas diferencias sensoriales se deben a la distinta composición de la leche de origen, especialmente en cuanto a grasa y proteína. Dentro de una misma especie, las variaciones en la composición de la leche se deben a factores genéticos, fisiológicos y ambientales.

Existen seis familias de queso de oveja importantes: blanco o fresco, de salmuera o de vinagre, duro y semi-duro, de veta azul, de cuajada extendida, y quesos de suero (requesón) (Medina, 2004).

Entre los quesos franceses elaborados con leche de oveja se destacan el queso Roquefort, Ossau-Iraty y Broccio, que representan el 40 % de todos los quesos producidos en Francia, con este tipo de leche.

El queso Roquefort es el tipo de queso azul de leche de oveja más importante, con origen muy antiguo y está protegido bajo una Denominación de Origen Protegida desde 1925. Se elabora con leche cruda de oveja en el sur de Francia y Córcega. La leche a una temperatura entre 28-30° C es inoculada con un estárter láctico mesofílico. Las esporas de *Penicillium roqueforti* se añaden a la leche, o se espolvorean, como una suspensión, sobre la cuajada, cuando ésta se pone en los moldes. Después del desuerado y el salado los quesos se transportan a cuevas naturales, aireadas y húmedas, donde tiene lugar la maduración. Los quesos con betas son de forma cilíndrica, de 10 cm de alto y un peso en torno a 2,5 y 2,9 kg.

El queso Ossau-Iraty se elabora en el suroeste de Francia, a partir de leche de oveja, bien cruda o bien pasteurizada. Tras el cuajado, la cuajada se calienta a 36 – 44° C. Los quesos maduran durante al menos 3 meses. Es similar al queso Roncal, hecho al sur de los Pirineos.

Broccio es un queso de suero producido en Córcega, que recibió la DOP en 1988. El suero fresco se mezcla con leche de oveja y se calienta a 80 – 90° C. La masa resultante se coloca en moldes y se desuera. Este queso se come fresco, dentro de las 48 h de elaboración y tiene un sabor suave.

En Grecia existe gran tradición en la producción de quesos. Un 39 % de la producción corresponde a queso de leche de vaca, un 36 % a quesos de leche de oveja y un 25 % a quesos de leche de cabra. En este país, 23 de las 26 tradicionales DOP de quesos se refieren a quesos elaborados con leche de oveja mezclada con leche de cabra.

El queso Feta es el queso griego tradicional más famoso. Es de pasta blanda, madurado y mantenido en salmuera (10-12 % NaCl) durante al menos dos meses. Se elabora con leche de oveja al 100 % o con una mezcla del 30 % de leche de cabra. Hoy en día se elabora a partir de leche pasteurizada con cultivos estárter mesofílicos y termofílicos. Presenta un sabor salado y ligeramente ácido, color blanco natural, una textura firme y lisa, y unas características organolépticas agradables.⁷

El queso Galotyri es de tipo blando, con textura untuosa y cremosa, producido con leche de oveja, de cabra, o mezcla de ambas. La leche se calienta hasta la cocción y se deja en recipientes a temperatura ambiente durante 24 horas. Se añade la sal y se dejan otros 2 – 3 días a temperatura ambiente. Se puede añadir el cuajo para favorecer la coagulación.

Kopanisti es otro queso blando griego, producido con leche de vaca, oveja o cabra, o mezcla de ellas. La leche se coagula a 28 – 30° C en 2 horas. La cuajada desuerada es salada, distribuida en recipientes, y se mantienen en un lugar fresco con alta humedad relativa para favorecer el crecimiento de moho en la superficie. Presenta una textura blanda, untuosa, con sabor salado y picante.

Kasseri es un queso griego semiduro de leche de oveja, que puede llevar hasta un 20 % de leche de cabra, pudiendo utilizarse leche cruda o pasteurizada. La cuajada se calienta a 38 – 40° C, se desura hasta que el pH baja a 5,2. La cuajada se corta en lonchas, que se extienden en agua a 70-80° C durante 15 minutos y se introducen dentro de moldes durante 2 – 3 días. Maduran en sal, a 18° C durante no menos que 3 meses.

El queso Graviera Kritis es un queso duro elaborado en Creta, a partir de leche de oveja. Es un queso tipo Gruyere, que sufre una limitada fermentación ácida y

propiónica, que aporta al queso un sabor ligeramente dulce. La leche se calienta a 70° C, y la cuajada se corta y se escalda a 50 – 52° C. Los quesos tienen un diámetro de 40 cm y pesan entre 14 y 16 kg. Se maduran durante 90 días a una temperatura entre 15 – 16° C.

Otro tradicional queso griego, de pasta dura es Kefalograviera, elaborado con leche de oveja o mezcla de leche de cabra y oveja, principalmente en el oeste de Macedonia. La cuajada se rompe y se calienta a 48° C, se moldea y prensa. El queso se mantiene a 14 – 16° C durante 24 horas, y en salmuera durante 2 días. La maduración se produce a 6° C durante al menos 3 meses. Es un queso de forma circular, con numerosos agujeros, agradable sabor salado y rico aroma.

Entre los quesos italianos se destacan por su importancia los tipos Pecorino Romano, Pecorino Siciliano, Pecorino Toscano y Pecorino Sardo.

De ellos, el más famoso es el queso Pecorino Romano, elaborado con queso de oveja, y textura dura, procedente del área alrededor de Roma y Cerdeña. La leche calentada a 68° C se inocula con un cultivo estárter, obtenido del suero residual del queso Ricotta. La cuajada se corta, se cocina a 45-46° C, y tras 30 minutos la cuajada se moldea y se presa para facilitar el drenaje del suero. Los quesos se salan cada 30-60 días y se maduran a 10 – 14° C durante 5 – 8 meses (Battistotti y Corradini, 1993).

El queso Pecorino Sardo es un queso semicocinado producido en Cerdeña, a partir de leche de oveja, inoculada con cultivo estárter natural de suero. Se usa cuajo animal para coagular la leche. La cuajada se calienta a 41-42° C y se mantiene a esta temperatura durante 10 minutos. Los quesos se mantienen en salmuera durante 48 horas, y se maduran durante 20-60 días, el tipo semicurado, mientras que la maduración es de 4 meses para el tipo de queso curado.

Pecorino Siciliano es otro de los quesos de pasta dura de Italia, se elabora con leche de oveja, empleando cuajo animal. Se consume en diferentes estados de maduración, fresco, salado durante 1 semana o curado tras 4 meses. Su composición y propiedades físico – químicas fueron descritas por Gattuso y col. (1995) y sus características microbiológicas por Giudici y col. (1997).

A diferencia de estos quesos italianos, Pecorino Toscano es un queso de pasta blanda o semiblanda, de la Toscana. Se emplea leche de oveja, inoculada con cultivos

estárter y a veces se añaden enzimas lipolíticas. La coagulación con cuajo animal tiene lugar a 35-38° C en 20 – 25 minutos. Los quesos se salan durante 24 horas, y se maduran por un periodo mínimo de 20 días para el queso blando y 4 meses para el queso semiblando. Su sabor es aromático y ligeramente picante. Sus características y tecnología fueron descritas por Neviani y col. (1998).

La mayoría de los quesos portugueses se fabrican siguiendo métodos tradicionales, a partir de leche cruda en la mayor parte de los casos, y sin añadir cultivo estárter. Los quesos portugueses más conocidos son Serra da Estrela, Serpa, Azeitao y Castelo Branco. Estos quesos, junto con alguno más, como Évora o Nisa, están amparados bajo DPO. La principal característica que distingue estos quesos de otros elaborados a partir de leche de oveja es su textura blanda o semi blanda, debido no a la leche o la tecnología empleada, sino al coagulante vegetal altamente proteolítico empleado (Medina, 2004).

El queso Azeitao es un queso de textura semi-blanda, con pocos o ningún agujero, hecho cerca de Lisboa. La coagulación de la leche salada se produce a una temperatura entre 30 – 35° C, mediante cuajo vegetal. Se madura en dos etapas, inicialmente los quesos permanecen a temperatura ambiente durante 10 días a 90 – 95 % de humedad relativa. Durante la segunda fase de maduración, los quesos se mantienen a 10-15° C y 85-90 % de HR durante 2 -3 semanas (Freitas y col., 2000).

Castelo Branco es un tipo de queso de textura semi – blanda, de la parte centro-oeste de Portugal (Freitas y col., 2000). Presenta un flavor más fuerte y ligeramente picante, y con una corteza más compacta que el queso Serra da Estrela. Este queso se obtiene tras un ligero desuerado de la cuajada después de la coagulación de la leche con cuajo vegetal a una temperatura de 20-30° C. Se maduran durante 40 – 50 días a 8-14° C y una HR de 80-90 %.

El queso Serpa presenta también una textura semi – blanda, con pocos o ningún agujero en su pasta, y se elabora en la región de Serpa, con leche de oveja Merino (Freitas y col., 2000). Se caracterizan por su fuerte sabor, bastante picante. Su maduración se produce en dos etapas, a 6-10° C y 95 – 100 % de HR y 7-11° C y 75-90 % de HR durante 30 – 40 días.

El queso portugués más tradicional es Serra da Estrela, producido en las montañas de Serra da Estrela. Se caracteriza por un fuerte aroma, un flavor ligeramente ácido y textura blanda con pocos ojos. En su proceso de elaboración la leche se calienta a 27-30° C y se coagula con cuajo vegetal durante 1 – 2 horas. La cuajada se corta manualmente y se coloca en los moldes, donde se desuera parcialmente. La maduración se prolonga durante 30-45 días, a 6-12° C y 85-90 % de HR (Sousa y Malcata, 1998).

España se caracteriza por ofrecer una gran variedad de quesos, entre ellos se destacan Afuega L’Pitu, Cebreiro, Arzúa-Ulloa, San Simón Da Costa, IGP Valdeón, Garrotxa, Tronchón, Rondeño, Monte Enebro, Peñamellera, Sierra de Cazorla, Gamonedo. Muchos de los quesos españoles están amparados bajo la marca de calidad Denominación de Origen Protegida, como Palmero, Manchego, Idiazábal, Roncal, Zamorano, La Serena, Torta del Casar, Tetilla, Mahón, Cantabria, Alt Urgell, Quesucos de Liébana, Ibores, Majorero, Murcia al vino, Cabrales y Picón de Bejes-Tresviso.

En España existen seis DOP de quesos elaborados con leche de oveja, Manchego, Roncal, Idiazábal y Zamorano, de pasta dura, y Queso de la Serena y Torta del Casar, de pasta blanda, elaborados con cuajo vegetal.

El queso Manchego se elabora con leche pasteurizada o cruda de oveja Manchega. Su forma es cilíndrica y su corteza dibuja el molde de esparto usado de forma tradicional. Si se utiliza leche cruda no se añade cultivo estárter, mientras que si se emplea leche pasteurizada, se añade un cultivo estárter láctico y mesofílico. La cuagulación se lleva a cabo con cuajo animal a 30 – 32° C en 30 – 40 minutos. La cuajada se corta en cubos de 4 – 6 mm y se escalda a 36-38° C durante 15 minutos mientras se remueve. Los quesos se presionan durante 6 – 18 horas, se salan en salmuera, durante 24-48 horas y se mantienen a 10-15° C durante al menos 2 meses.

Idiazábal es un queso de textura semidura o dura, producido en el País Vasco y Navarra, a partir de leche de ovejas Lachas. Su producción industrial está basada en los métodos tradicionales. Se añaden cultivos iniciadores homofermentativos previamente a la coagulación de la leche, la cual se realiza mediante cuajo animal a 30° C. La cuajada se corta en gránulos de 5-10 mm y se calienta a 37° C. Se coloca en moldes, se prensa durante 6 horas, se sala durante 24 – 48 horas mediante inmersión en salmuera, o con sal seca. Los quesos maduran a 10° C y 80 % de HR durante 2 -12 meses. El proceso de

ahumado que se aplica al tercer mes del proceso de maduración, mediante la combustión de madera de *Alnus glutinosa* durante 24 h a 15° C es opcional.

El queso Roncal es de pasta dura, elaborado en Navarra, con leche cruda de oveja. Su procesado es similar al del queso Manchego, excepto en que la temperatura de coagulación es más alta (32 -37° C), son de menor tamaño y el tiempo de maduración es de 4 meses. Las características bioquímicas y microbiológicas de este queso han sido publicadas (Ordóñez y col., 1980; Millán y col., 1992; Arizcun y col., 1997).

En Zamora se produce el queso Zamorano, de pasta dura, elaborado a partir de leche cruda de ovejas Churra y Castellana. La leche se coagula, con cuajo animal a 28-32° C durante 30-45 minutos. La cuajada se corta en piezas de 5 – 10 mm, y se calienta a 38-40° C antes del moldeado y prensado. Los quesos se salan, bien con sal seca, o por inmersión en salmuera durante 36 h, y se maduran al menos durante 100 días.

El Queso de la Serena se caracteriza por su pasta semi-blanda y se produce en el sureste de Extremadura, a partir de leche de oveja Merino. La leche cruda se coagula a 25 – 32° C durante 50 – 70 minutos con cuajo vegetal, obtenido mediante la maceración de flores secas de *C. cardunculus* durante 24 h. La cuajada se corta en granos de 10-20 mm y después se elimina el suero. Tras el prensado de la cuajada en los moldes, la maduración se produce durante al menos 60 días a 8-12° C y 85-95 % HR. Su corteza es de color marrón, y la pasta toma la textura blanda debido a la proteólisis que ejerce el cuajo vegetal.

La Torta del Casar es un queso de pasta semiblanda, producido en la zona centro de Extremadura, alrededor de Cáceres, a partir de leche cruda de oveja Merino, la cual se coagula mediante cuajo vegetal a 25 – 30° C. El proceso de elaboración es similar al descrito para el Queso de La Serena (Mas Mayoral y col., 1991).

Recientemente se ha aprobado la Norma de composición y características específicas para el queso “Ibérico”, mediante el R.D. 262/2011 de 28 de febrero, en el que se define como un queso de pasta prensada, no cocida, de consistencia semidura a dura, de forma cilíndrica, con dimensiones variables, de altura comprendida entre 7 y 12 cm y diámetro entre 9 y 24 cm, y pesos variables sin sobrepasar 4 kg. Corteza de consistencia semidura a dura y aspecto seco, con coloración que puede presentar tonalidades variables desde blanco amarillento hasta el negro verdoso. Pasta de textura

firme y compacta y color blanco amarillento. Se elabora a partir de leche de oveja, vaca y cabra.

I.1.4. La Torta del Casar

I.1.4.1. Descripción de la Torta del Casar

La Torta del Casar es un queso de pasta blanda, obtenido por coagulación enzimática (Chamorro y Losada, 2002), elaborado con leche de oveja en Casar de Cáceres y pueblos de los alrededores. Las piezas son de forma cilíndrica, con las caras marcadas por rayas, con la corteza lisa y cerosa. Con la masa interior cerrada, blanda y untuosa. Su sabor es agradable, algo amargo y mantecoso al paladar.

La zona de producción abarca 36 términos municipales de la provincia de Cáceres, aunque tradicionalmente la Torta del Casar se ha elaborado en los términos de Casar de Cáceres, Arroyo de la Luz, Garrovillas, Malpartida de Cáceres, Hinojal, Santiago del Campo, Sierra de Fuentes, Torreorgaz y Valdefuentes. Se trata de un queso puro de oveja de la razas “Merina” y “Entrefina”, elaborado con leche cruda y con una maduración mínima de 60 días. Su corteza es fina y ligera, de color amarillo céreo a ocre. En ocasiones dicha corteza se agrieta, permitiendo el vertido de su pasta, que es untuosa, cremosa, casi líquida, de color amarillento, y sabor y aroma excepcional. La elaboración se caracteriza por el empleo como coagulante de la leche de la flor del cardo *Cynara cardunculus* L. (Mesías y col., 2001).

La DOP Torta del Casar fue aprobada por Orden de 9/10/2001 de la Consejería de Agricultura y Medio Ambiente de la Junta de Extremadura (DOE del 13/10/2001). La Torta del Casar es un queso español con DOP a nivel europeo por el Reglamento (CE) 1491/2003 de la Comisión Europea.

El término Torta del Casar se refiere a su origen. El primero de los nombres se debe a su forma original, aplastada, por la falta de firmeza de la pasta interior, que no se endurecía, y recordaba más a las tortas de harina que a los quesos tradicionales. El segundo nombre hace mención a la población de Casar de Cáceres, cuna del producto, que se encuentra en la provincia de Cáceres, a 10 km al norte de la capital, en la comunidad autónoma de Extremadura.

Esta zona de influencia de la *DOP Torta del Casar* ha estado históricamente relacionada con las prácticas de pastoreo y trashumancia. La calzada romana Vía de la Plata recorre la región extremeña de norte a sur, atravesando Casar de Cáceres, siendo durante siglos, paso obligatorio de los rebaños, tal como se recoge en el Fuero Juzgo y en las normas que regían al Honrado Concejo de La Mesta. Existe constancia de la presencia de rebaños asentados en la zona desde 1291, cuando el Rey Sancho IV otorga a la aldea del Casar el Privilegio Real, por el que los ganaderos pueden llevar a pastar a sus ganados a las tierras adehesadas de media legua de extensión alrededor de dicha aldea. Así mismo se conoce que ya en esta época la Torta del Casar era utilizada como moneda de pago, aunque no fue hasta 1791 cuando Gregorio Sánchez de Dios deja constancia escrita de la existencia tanto del queso, como de las cabezas de ganado lanar que lo producían.

La materia prima con la que se elabora la Torta del Casar es la leche de oveja, de las razas merina y entrefina, las cuales se caracterizan por su rusticidad, su capacidad de adaptación a entornos naturales extremos, y su baja producción lechera, en torno a 75 l/oveja y año. Este ganado ha estado vinculado al sistema de explotación tradicional de la zona, extensivo o semiextensivo, alimentándose de los pastos del ecosistema típico del área que abarca la DOP, si bien en determinadas épocas del año necesita una suplementación alimenticia, a base de forrajes o piensos.

I.1.4.2. Proceso de elaboración de la Torta del Casar

La leche empleada en la elaboración de la Torta del Casar debe ser, según el Reglamento DOP (2001) natural, íntegra, no estandarizada, obtenida del ordeño de ovejas sanas de las ganaderías inscritas. La leche debe estar limpia, sin impurezas, exenta de inhibidores, productos medicamentosos, conservantes, etc., que puedan influir negativamente en la elaboración, maduración y conservación de la “Torta del Casar”, así como en las condiciones higiénicas y sanitarias de la misma. Debe presentar como mínimo un 5 % de proteína, un extracto mínimo quesero de un 11 %, 6,5 % de materia grasa, 18 % de extracto seco total, una acidez máxima de 22° Dornic y un pH mínimo de 6,6 y máximo de 6,9.

En el proceso de elaboración de la Torta del Casar no se añaden cultivos starter y se emplea coagulante vegetal, obtenido previamente de la maceración de las flores del

cardo (*C. cardunculus*) en agua. El uso de la leche cruda de oveja Merina y del coagulante vegetal le dan las características del ligero amargor y la textura blanda (Delgado y col., 2010).

Existen varias formas diferentes de preparar el extracto acuoso de las flores de cardo, y puede decirse que cada elaborador tiene su propio método de prepararlo. Sin embargo, todos ellos preparan el extracto cada día previamente al proceso productivo del queso. Normalmente las flores secas se cortan y se secan durante el verano anterior y los elaboradores de queso lo compran en mercados locales en cantidad suficiente para la producción del año. En esencia, las flores secas se maceran en agua a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo variable, algunas veces machacando las flores en un mortero. Tras este tiempo, las flores se filtran a través de una tela o gasa, el líquido de color marrón resultante se añade a la leche (Roseiro, 1991). La cantidad de flores secas y agua empleadas para la preparación del coagulante depende de la cantidad de leche a cuajar, la calidad visual de las flores secas y la experiencia del fabricante (Roseiro y col., 2003).

La elaboración del queso comienza con el calentamiento de la leche a 26-33° C, tras la adición del cuajo, la coagulación de la leche tiene lugar tras 50-90 minutos. Una vez obtenida la cuajada será sometida a cortes sucesivos hasta conseguir granos de tamaño fino, tipo grano de arroz. La cuajada es cortada para aumentar la superficie de contacto, facilitando la separación del suero de la cuajada. Entonces la cuajada se deposita en moldes cilíndricos adecuados a las dimensiones del queso y es prensada durante 5 horas como máximo, hasta a una presión máxima de 3 kg/cm². El proceso de salado puede ser seco o húmedo, utilizándose exclusivamente cloruro sódico. En caso de salazón húmeda el tiempo de permanencia en salmuera será de 6 horas como máximo, en una solución de una concentración máxima de 16 Baumé. La maduración mínima será de 60 días, siempre que cumpla la normativa sanitaria vigente, bajo una temperatura de 4 a 12° C y una humedad relativa de 75-95 % (Reglamento DOP, 2001).

Tradicionalmente, la sal es añadida a la leche durante el proceso de coagulación de la leche (Macedo y col., 1993), con el fin de facilitar la coagulación de la leche, dado que la sal contribuye a la estabilización de las micelas (Bautista y col., 1999).

Durante la etapa de maduración se produce esa intensa actividad proteolítica que da lugar a la formación de la Torta, generándose las características de textura, sabor y aroma tan peculiares de este producto.

I.1.4.3. Características de calidad de la Torta del Casar

Según la regulación de la DOP, los quesos “Torta del Casar” presentarán forma cilíndrica, con caras sensiblemente planas, y superficie perimetral plano convexa. Se establecen tres formatos en función del peso de la pieza, (A) de 200 a 500 g, (B) de 501 a 800 g, (C) de 801 a 1200 g. Las dimensiones permitidas son un diámetro mínimo de 7 cm y que la relación entre altura y diámetro máxima sea de un 50 %. En cuanto a las propiedades físico – químicas, este producto debe contener un mínimo de 50 % de grasa sobre extracto seco, un mínimo de 50 % de extracto seco, un pH comprendido entre 5,2 y 5,9 y un máximo de 3 % de NaCl (DOE, 2001).

Respecto a las características organolépticas, el Reglamento establece que la corteza debe estar definida y ser diferenciada de la pasta, con color uniforme de tonalidades ocres sin adición de colorantes, con presentación tradicional untada en aceite, pudiendo presentar grietas en su superficie. La pasta será blanda a muy blanda, uniforme, de color amarillento, puede presentar ojos redondeados propios de la maduración, repartidos en el corte. La textura es la cualidad fundamental y diferencial de este queso. La Torta del Casar muestra en corte alta cremosidad y untuosidad. En boca presenta sensación grasa media, capacidad fundente alta y arenosidad baja o nula. Su olor será a animal agradable de intensidad media, y vegetal de intensidad media o baja. El sabor se caracterizará por un amargor medio o bajo, salado bajo, acidez baja o nula, gusto residual persistente, animal agradable medio y vegetal medio o bajo.

Delgado y col. (2010) caracterizaron el perfil de compuestos volátiles del queso Torta del Casar, durante su maduración, a lo largo de 90 días. Destaca la mayor importancia de los ácidos carboxílicos con origen en la actividad microbiana (ácido acético y propiónico) y la degradación de amino ácidos (ácido 2-metil-propiónico, ácido 3-metilbutanoico), sobre aquellos procedentes de la lipólisis (ácidos butanoico, pentanoico, hexanoico, heptanoico, octanoico, decanoico, y dodecanoico), y lo considera una característica única de este tipo de queso, que puede relacionarse con el aroma típico del queso Torta del Casar. Este aroma puede diferenciar al queso Torta del

Casar de otros quesos en el mercado. Este flavor típico y diferencial del queso Torta del Casar puede deberse a la alta concentración de etil ester, encontrada por Delgado y col. (2010), dado su bajo umbral de percepción.

Descriptores del olor asociados con el aroma típico del queso Castelo Branco son ácido, olor a oveja y notas picanes (Ferreira y col., 2009).

I.1.4.4. Flora característica de la Torta del Casar

La acción de enzimas proteolíticas y lipolíticas y los metabolitos producidos por la flora secundaria de los quesos juegan un importante papel en la formación de la textura y el sabor del queso. Este hecho afecta especialmente a los quesos elaborados con leche cruda, debido a la abundancia de microorganismos no lácticos. Las Micrococcaceas han sido identificadas en la mayoría de las variedades de quesos como uno de los principales componentes de la flora secundaria, que permanece a lo largo de la maduración, probablemente debido a su resistencia a la sal (Cáceres y col, 1997).

El hecho de que la Torta del Casar se elabore a partir de leche cruda de oveja, permite a la microflora indígena o autóctona, principalmente bacterias ácido lácticas, LAB, jugar un importante papel durante la elaboración del queso, principalmente durante la maduración. Sin embargo, esta es también la mayor causa de variabilidad en las características organolépticas y calidad global del producto final, debido a la falta de entendimiento (y por tanto difícil control) de los cambios bioquímicos producidos por los microorganismos en la matriz del queso. Por tanto, urge algún grado de estabilización en las prácticas de elaboración del queso, lo cual requiere que los productores del queso elijan cultivos starter bien definidos y específicos, basados en su comportamiento tecnológico (Pereira y col., 2010).

La microbiología de la Torta del Casar fue investigada por Pouillet (1991), y encontró que los máximos recuentos de *Lactococci*, *Lactobacilli*, *Leuconostocs* y *Enterococci* se alcanzan durante los primeros 15 días de maduración. Los recuentos de *Coliformes* son de 10^5 - 10^6 ufc/g durante el primer mes y decrecen a 10^2 - 10^4 ufc/g a los 60 días, mientras que el número de *Staphylococci* coagulasa-positivo son 10^2 - 10^3 ufc/g durante el primer mes, y disminuye a 10 ufc/g a los 60 días. Las especies predominantes de LAB durante la maduración fueron *Lc. lactis subs. lactis*, *Leuc. mesenteroides subs.*

dextranicum, *Leuc. mesenteroides* subs. *mesenteroides*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum* and *E. faecalis* (Pouillet y col., 1993).

La caracterización de la microflora del queso de Casar de Cáceres (que más tarde dio lugar al queso Torta del Casar) ha sido publicada por Cáceres, Castillo y Pizarro (1997), Pouillet, Huertas, Sánchez, Cáceres and Larriba (1991; 1993). La mayoría de los microorganismos identificados por estos autores eran bacterias ácido lácticas, aunque también encontraron micrococcaceas, corynebacterias y levaduras. La presencia de microorganismos del género enterococos fue destacable en su estudio, lo cual fue observado en otros quesos elaborados con leche cruda de oveja. La razón de la prevalencia de enterococos frente a lactococos podría deberse a las deficientes condiciones higiénicas en las que se elaboraban y maduraban estos quesos, a la presencia de animales cerca del lugar donde se elaboraban los quesos y probablemente a su capacidad para crecer en soluciones altamente salinas. En la identificación a nivel de especies, *Lactococci* fueron aislados durante los primeros 15 días, y todas las cepas fueron identificadas como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Entre los enterococos, aislados a lo largo de todo el periodo de maduración, las especies más abundantes fueron *Ec. faecalis* y *Ec. avium*, mientras que *Ec. faecium* y *Ec. gallinarum* fueron mucho menos abundantes. Respecto al género *Leuconostoc*, también aislado a lo largo de la maduración, las especies identificadas fueron *Lc. mesenteroides* subsp. *dextranicum* and *Lc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. Las especies más abundantes pertenecientes al género *Lactobacillus* fueron *Lb. curvatus* y *Lb. plantarum*. *Lb. rhamnosus* y *Lb. brevis* fueron también comunes. Es generalmente aceptado que *Lb. plantarum* y *Lb. casei* constituyen la microflora principal de muchas variedades de quesos, sin embargo *Lb. curvatus* no había sido descrito en quesos y en cambio, fue uno de los lactobacilos más abundantes que encontraron Puollet y col. (1991), que explicaron su presencia en el queso de Casar de Cáceres por el hecho de estar cuajado con cuajo vegetal, dado que este microorganismo era frecuente en vegetales y en leche.

El uso de leche cruda para elaborar algunas variedades de queso tradicionales conlleva altos recuentos de microorganismos, como enterobacterias y coliformes, dos indicadores de la calidad microbiológica. La adición de cultivos starter a la leche cruda parece reducir las poblaciones de estos microorganismos durante la maduración en los quesos de La Serena y Los Pedroches (Sánchez y col., 1995).

Uno de los mayores problemas asociados a los quesos elaborados a partir de leche cruda es la presencia de microorganismos indeseables a lo largo de los procesos de elaboración y maduración. El uso de leche cruda, y por tanto la ausencia de procesos térmicos de estandarización, unido con los diferentes protocolos de manejo y manipulación, y por ello las diferentes condiciones higiénicas que prevalecen en las granjas, dan lugar a una gran e imprevisible variabilidad. Los quesos portugueses con DOP son un ejemplo de este tipo de productos. Son elaborados de forma tradicional a partir de leche cruda y entera y el desarrollo de sus características depende la flora microbiana indígena. La contribución de esta microflora, unido con la composición de la leche, la cual depende de la dieta de los animales y sus condiciones fisiológicas, finalmente da lugar al sabor y textura únicos de este tipo de quesos (Pereira y col., 2010).

Varios microorganismos, incluyendo bacterias, levaduras y mohos, están presentes en el queso durante la maduración. Por tanto, contribuyen a la maduración, directamente vía su actividad metabólica o indirectamente, vía la liberación de enzimas en la matriz del queso, después de la autólisis. Aunque la mayoría de la microflora de la leche cruda comprende bacterias ácido lácticas (LAB), como *Lactococcus* y *Lactobacillus spp.*, la inclusión pasiva de microorganismos indeseables como *Coliformes*, *Staphylococcus spp.*, *Pseudomonas* e incluso *Listeria spp.* aumenta el potencial de amenaza contra la salud pública (Almeida y col., 2007).

Aunque los quesos mencionados se consumen después de un tiempo mínimo de maduración de 45 días a una temperatura de 10° C (Macedo y col., 1993), que son condiciones letales para la mayoría de los microorganismos contaminantes, su acción mientras son viables puede afectar a las características del producto final. La adición de cultivos starter puede conllevar una contribución favorable para el crecimiento de microorganismos indeseables. En particular, la acción de LAB vía fermentación inicial de lactosa y la rotura de proteínas, o vía reacciones catabólicas más complejas al final de la maduración, es bien conocida como contribuyente a las características organolépticas percibidas en el queso final (Menéndez y col., 2000). Además, se han reconocido levaduras que juegan un papel importante en el queso Serra da Estrela (Macedo y col., 1993; Freitas y Malcata, 2000). Las bacterias ácido lácticas y coliformes aparecieron como los grupos microbianos predominantes en el queso Serra da Estrela (Tavaira y col., 1998), en el cual alcanzaron valores de 10^7 y 10^5 ufc/g,

respectivamente, al final de la maduración. Por otra parte, gran parte del conocimiento existente se deriva de estudios que engloban el crecimiento de cultivos puros testados en medios sintéticos, pero más atención se pone en las cepas autóctonas de cada ambiente. Además, debe tenerse en cuenta que las matrices de los quesos actuales albergan células de microorganismos en diversos estados fisiológicos, crecimiento, latente, muerto y autolizados (Fleet, 1999).

Vioque y col. (2000) analizaron la microbiología del queso de Los Pedroches, elaborado con leche cruda de oveja y cuajo vegetal, procedente de la flor de *Cynara cardunculus*, a lo largo de la maduración. Encontraron que los recuentos de viables totales alcanzaban el máximo en las etapas iniciales de la maduración. Otros grupos microbianos, enterobacterias, coliformes, lactobacilos, mohos y levaduras, alcanzaron los recuentos máximos entre los días 2 y 8 de maduración, y después disminuyeron a diferentes niveles hasta el final de la maduración.

Fernández-Salguero y col. (1999) estudiaron la carga microbiana de los extractos de flores usados como cuajo vegetal en la elaboración del queso Los Pedroches y encontraron altos recuentos de viables totales, enterobacterias y coliformes. Los recuentos de la leche cruda utilizada en este queso también fueron altos en todos los grupos de microorganismos analizados. Después de dos días de maduración de los quesos, los recuentos de viables totales en quesos fueron casi 5 log unidades más altos que en la leche y del orden de 4 log unidades para enterobacterias, coliformes y lactobacilos. Este hecho se explica por el crecimiento microbiano que se produce durante la fase de coagulación de la leche, a unos 30° C, y porque la adición del cuajo vegetal aporta contaminación microbiana a la leche inicial.

I.1.4.5. Presencia de aminas biógenas en quesos

Las aminas biógenas son compuestos nitrogenados de importancia biológica en las células vegetales, microbianas y animales. Se forman principalmente mediante descarboxilación de aminoácidos y transaminación de aldehídos y cetonas, en todos los alimentos que contienen proteínas y aminoácidos libres y están sujetos a condiciones que favorecen la actividad microbiana o bioquímica (Silla-Santos, 1996). Los quesos se encuentran entre los alimentos altamente proteicos, en los que la actividad microbiana y enzimática provocan la formación de aminoácidos y aminas biógenas (Laleye y col.,

1987). De hecho, durante la maduración del queso, la degradación de las caseínas da lugar a la acumulación de aminoácidos que pueden ser convertidos en aminas biógenas mediante la actividad de las bacterias descarboxilasas (Halasz y col., 1994).

Durante la maduración de los quesos se presentan condiciones (temperatura, pH, humedad, concentración de sales, disponibilidad de sustrato) que favorecen la actividad descarboxilante de las bacterias productoras de aminas biógenas, como triptamina, putrescina, cadaverina, tiramina, histamina, espermina y espermidina. Durante la maduración de los quesos ocurren transformaciones en las características físicas, químicas y sensoriales, generando el sabor, olor, color y textura que le son particulares a cada tipo de queso madurado (Chang y col., 1985; Scott, 1991; Veisseyre, 1972). Los cultivos iniciadores hidrolizan las cadenas polipeptídicas liberando aminoácidos, sustrato de las enzimas descarboxilasas microbianas para la producción de aminas biógenas (Silla-Santos, 1996). Durante este proceso existen condiciones ambientales y de almacenamiento, que afectan a la textura del queso y pueden favorecer el crecimiento de enterobacterias. Estos microorganismos pueden estar presentes por inadecuada manipulación higiénica y tienen capacidad de producir aminas biógenas (Novella y col., 2002, Scott, 1991).

El interés en la determinación de las aminas se debe a su capacidad para afectar directa o indirectamente al sistema vascular y nervioso humano. De hecho una gran cantidad de aminas biógenas pueden causar sarpullidos, dolor de cabeza, náuseas, hipo o hipertensión, palpitación cardíaca, hemorragia cerebral, shock anafiláctico, especialmente cuando se ingiere al mismo tiempo alcohol o inhibidores amino oxidasa (MAO-Is) (Lange y col., 2002; Stratton y col., 1991; Vinci y Antonelli, 2002). Además, en el caso específico del queso, puede usarse la determinación de aminas biógenas como un parámetro de la calidad higiénica del proceso de elaboración (Antila y col., 1984; Mah y col., 2002; Marino y col., 2000) o como indicador del grado de proteólisis y la tipicidad de algunos quesos particulares (Celano y col., 1992; Innocente y D'Agostin, 2002).

Se han propuesto varios métodos para la determinación de aminas biógenas en alimentos, desde electroforesis capilar (CE), cromatografía de capa fina (TLC) (Celano, y col., 1992), cromatografía de gases (GC), cromatografía de intercambio iónico (Standara y col., 2000) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Mah y col.,

2002, Marino y col., 2000). Entre los métodos citados, la fase reversa (RP)-HPLC se considera el más adecuado (Moret y Conte, 1996).

I.1.4.6. Proteólisis

La proteólisis es uno de los mecanismos más importantes que ocurren durante la maduración de los quesos, en el que las enzimas del cuajo juegan un papel vital, especialmente en las primeras fases de la maduración, y afectan al rendimiento, la textura, así como en el flavor del queso (Silva y Malcata, 2005), lo cual ha sido objeto de estudio en numerosas revisiones. La proteólisis contribuye a los cambios de la textura de la matriz del queso, debido a la hidrólisis de la red de proteínas, el descenso de la actividad de agua, mediante el secuestro del agua por grupos carboxyl y amino liberados, y un incremento del pH (en particular en la superficie de los quesos madurados con moho), lo cual facilita la liberación de compuestos sápidos (sabrosos) durante la masticación. Ello contribuye directamente al flavor y al mal sabor (como el amargor) del queso, mediante la formación de péptidos y aminoácidos libres, así como la liberación del sustrato (aminoácidos) para los cambios catabólicos secundarios, como la transaminación, deaminación, decarboxilación, el catabolismo de los aminoácidos aromáticos y reacciones de aminoácidos con otros compuestos (Sousa y col., 2001).

Durante la proteólisis las proteínas son degradadas a productos primarios (polipéptidos) y posteriormente a productos secundarios como péptidos de medio y pequeño tamaño, y finalmente a amino ácidos libres (Desmazeaud y Gripon, 1977). La proteólisis da lugar a sustancias que son importantes para el flavor en sí, o que actúan como precursores del aroma (Adda y col, 1982). La primera proteólisis causa la textura blanda del queso al inicio de la maduración, trastornando la matriz tridimensional de proteínas. La segunda proteólisis genera péptidos tan pequeños que pueden ser detectados por los receptores del gusto de los humanos, pero que también pueden servir como sustratos para las proteinasas y peptidasas microbianas, que dan lugar a péptidos más pequeños y amino ácidos libres. La alteración de la textura del queso también influye en la liberación de compuestos del aroma durante la masticación (Fox y col., 1993).

Durante la maduración, la proteólisis es catalizada por enzimas procedentes de (i) el cuajo (quimosina, pepsina o proteinasas ácidas de plantas), (ii) la leche (plasmin y

quizás cathepsina D y otras proteinasas de células somáticas), (iii) enzimas de cultivos starter, (iv) no starter, (v) cultivos secundarios (*P. camemberti*, *P. roqueforti* y otros coryneformes) y (vi) proteinasas o peptidasas exógenas, o ambos, usados para acelerar la maduración (Sousa y col., 2001).

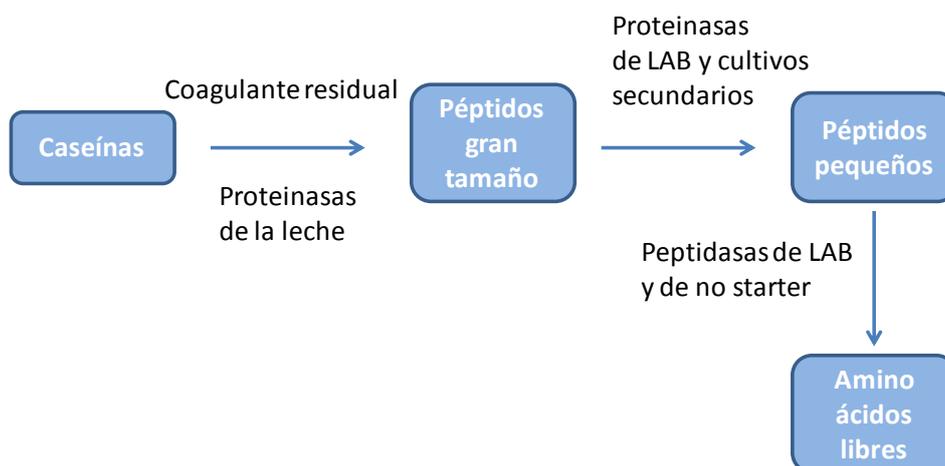


Figura V.6. Agentes que intervienen en la proteólisis del queso durante la maduración.

En muchas variedades de quesos, la hidrólisis inicial de caseínas es provocada por el cuajo y en menor medida por plasmin, lo que resulta en la formación de péptidos grandes (insolubles en agua) y medianos (solubles en agua), que son degradados posteriormente por el cuajo y por las enzimas procedentes del cultivo starter o de la microflora (no starter) del queso. Los productos finales de la proteólisis son amino ácidos libres y su concentración en queso en cualquier fase de la maduración es el resultado neto de la liberación de amino ácidos de caseínas, su degradación a productos catabólicos y quizás algunos sintetizados por la microflora del queso (Sousa y col., 2001).

I.1.4.7. Lipolisis

La lipolisis es un importante mecanismo bioquímico que ocurre durante la maduración del queso, ya que es una de las vías de generación del flavor del queso. Los ácidos grasos libres son importantes precursores de reacciones catabólicas, que producen compuestos volátiles y contribuyen al flavor (McSweeny y Sousa, 2000).

La grasa en la leche está presente en forma de glóbulos que durante el proceso de cuajado son casi totalmente incorporados a la red de caseínas. Las interacciones entre los glóbulos de proteína- proteína y de proteína – grasa influyen en la estructura de la cuajada y en el rendimiento del queso (Martini y col., 2008).

La grasa de la leche de animales rumiantes contiene un amplio rango de ácidos grasos. Los principales ácidos grasos libres en la leche son los ácidos butanoico (C4:0), hexanoico (C6:0), octanoico (C8:0), decanoico (C10:0), dodecanoico (C12:0), tetradecanoico (C14:0), hexadecanoico (C16:0), octadecanoico (C18:0), cis-9-octadecanoico (C18:1), cis, cis-9, 12-octadecadienoico (C18:2), y cis-9, 12, 15-octadecatrienoico (C18:3) (Jensen y col., 1962; 1991). De todos ellos, los ácidos hexadecanoico y octadecanoico son los más abundantes (Banks, 1991, Gunstone y col., 1994), que representan aproximadamente el 25 y el 27 % respectivamente del total de los lípidos (Jensen y col., 1962). Los principales lípidos de la leche son los triacilglicéridos, que suponen más del 98 % del total de los lípidos (Gunstone y col., 1994). Los triacilglicéridos son ésteres de glicerol compuestos por una columna de glicerol con tres ácidos grasos unidos (Stryer, 1988). Por otra parte, los fosfolípidos representan menos del 1 % de los lípidos de la leche, pero tienen gran importancia en la membrana grasa de la leche, ya que permiten la estabilización de emulsiones de aceite en agua y de agua en aceite. De media, los fosfolípidos contienen más y más largos ácidos grasos insaturados que los triacilglicéridos (Banks, 1991; Jensen y col., 1991). Los principales fosfolípidos encontrados en la grasa de la leche son phosphatidyl choline, phosphatidyl ethanolamine y sphingomyelin (Gunstone y col., 1994). Otros lípidos polares se han descrito en la leche en cantidades traza, como ceramidas, cerobrosidos y gangliosidos. El colesterol es el esteroles más abundante en la leche (más del 95 % de todos los esteroles) y supone menos del 0,3 % del total de los lípidos (Jensen y col., 1991).

Los lípidos de los alimentos pueden sufrir oxidación o degradación hidrolítica (McSweeney y Sousa, 2000). La oxidación de los lípidos no ocurre de manera significativa en los quesos, probablemente debido a su bajo potencial redox (-250 mV) (Fox y Wallace, 1997; Fox y col., 2000; McSweeney y Sousa, 2000) y a la presencia de antioxidantes naturales (por ejemplo la vitamina E) (Fox y McSweeney, 1998), por lo que su contribución al flavor del queso no es importante (Fox y Wallace, 1997; Fox y col., 2000; McSweeney y Sousa, 2000). Sin embargo, la hidrólisis enzimática de los

triacilglicéridos a ácidos grasos y glicerol, mono- o diacilglicéridos (lipólisis) es esencial para el desarrollo del flavor de algunos quesos (McSweeny y Sousa, 2000).

La lipólisis en el queso se debe a la presencia de enzimas lipolíticas, hidrolasas, que rompen la unión ester entre un ácido graso y el corazón de un glicerol del triacilglicérido, produciendo ácidos grasos libres, y mono- y diacilglicéridos (Deeth y Touch, 2000). Las enzimas lipolíticas se clasifican en estererasas y lipasas (Chich y col., 1997). Las lipasas en el queso pueden tener su origen en diferentes fuentes, como son la leche, el cuajo, el cultivo starter, el cultivo adjunto al starter, las bacterias no starter y la adición como lipasas exógenas (Fox y Wallace, 1997; McSweeny y Sousa, 2000).

El uso de cuajo de *Cynara cardunculus* conlleva una mejora en la lipólisis en los quesos, lo cual aumenta con la edad, lo que sugiere una ligera actividad lipasa en el extracto, el cual puede ser debido a la actividad lipolítica inherente de las enzimas proteolíticas (Agbola y col., 2009).

Para hidrolizar la grasa de la leche en queso las bacterias ácido lácticas (LAB) poseen enzimas esterolíticas y lipolíticas, capaces de hidrolizar un rango de esteres de ácidos grasos libres y sustratos tri-, di- y monoacilglicéridos (Chich y col., 1997; Fox y Wallace, 1997). A pesar de la presencia de estas enzimas, LAB, especialmente *Lactococcus* y *Lactobacillus* spp. son generalmente considerados débilmente lipolíticos en comparación con especies como *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Flavobacterium* (Fox y col., 1993; Chich y col., 1997). Sin embargo, debido a que están presentes en el queso en números muy altos a lo largo de la maduración, se considera que LAB son probablemente los responsables de la liberación de significativos niveles de ácidos grasos libres.

La liberación de ácidos grasos libres, resultado de la lipólisis en el queso, da lugar a compuestos del flavor y aroma, como metilcetonas, lactonas, esteres, alcanos y alcoholes secundarios (Gripon y col., 1991; Fox y Wallace, 1997; McSweeny y Sousa, 2000).

La grasa en el queso es el componente más importante que influye, no solo en sus propiedades físicas, sino principalmente en el desarrollo del flavor. Sanjuán y col. (2002) encontraron que los quesos elaborados con cuajo vegetal (*C. cardunculus*) contenían más grasa que los quesos elaborados con cuajo animal, ya que parece que el

cuajo vegetal presenta una mayor capacidad para capturar componentes grasos en la cuajada. Este mayor contenido en grasa puede explicar la textura más fina y mayor untuosidad descritos para los quesos producidos con cuajo vegetal cuando fueron evaluados sensorialmente.

I.1.4.8. Compuestos volátiles en el queso

El flavor del queso es uno de los criterios determinantes para la elección y aceptación del consumidor. El perfil de volátiles refleja la imagen del olor y aroma de los quesos. Por tanto, el flavor único de una variedad de queso es el resultado de un balance complejo entre compuestos químicos volátiles y no volátiles, originados durante el proceso de maduración a partir de la grasa, la proteína y los hidratos de carbono de la leche (Fox y Wallace, 1997), como consecuencia cada producto tiene una composición única y característica de compuestos volátiles (Plutowska y Wardencki, 2007). El flavor del queso es muy complejo y diferencia a unos quesos de otros (Tomasini y col., 1993).

La fracción volátil de los quesos y consecuentemente sus características sensoriales están influidas por las condiciones climáticas y por la calidad de la leche cruda, las cuales dependen de la especie animal, la genética, la alimentación y el manejo de los animales. La microflora adventicia o espontánea de la leche cruda jugará también un papel relevante (Collomb y col., 1999; Fernández – Garcia y col., 2006; Freitas y Malcata, 2000; Nájera y col., 1993; Perea y col., 2000; Tavaría y col., 2002; Tavaíra y col., 2004.)

El flavor del queso maduro es el resultado de una serie de cambios bioquímicos, que ocurren en la cuajada durante la maduración del queso, provocados por la interacción de bacterias starter, enzimas de la leche, enzimas del cuajo, lipasas y flora secundaria (Urbach, 1997). Los numerosos compuestos involucrados en el aroma y flavor del queso se derivan de tres principales rutas catabólicas, catabolismo de la lactosa y el lactato, lípidos y proteínas (Molimard y Spinnler, 1996).

En la primera ruta, dependiendo de la variedad, microflora y condiciones de maduración, el lactato puede ser metabolizado por un número de rutas a varios compuestos, los cuales contribuyen al flavor del queso (McSweeney y Sousa, 2000).

La lactosa es el hidrato de carbono más importante en la leche. Su presencia es transitoria en el queso, ya que desaparece rápidamente de la cuajada debido a la fermentación glicolítica a cargo de los microorganismos, produciendo ácido láctico, lo cual determina la acidez del queso y favorece la acción del cuajo, la retracción de la cuajada y el desuerado, dando a la cuajada ciertas características que influyen en el flavor final y la textura del queso. También inhibe el crecimiento de algunos microorganismos que producen gas y flavor y aromas desagradables. Según Webb y Johnson (1965) la presencia de lactosa sólo es posible en las dos primeras semanas de maduración en algunos quesos blandos.

La segunda ruta genera compuestos derivados de grasas, formados mediante lipólisis y reacciones de oxidación lipídica, como por ejemplo ácidos grasos libres, ésteres, lactonas y cetonas, con bajos umbrales de percepción (Kinsella, 1975; Siek y col., 1971). La lipólisis es llevada a cabo por los microorganismos y las lipasas nativas de la leche, lo cual es especialmente importante en quesos elaborados con leche cruda, en los que la lipasa nativa no se desactiva con la pasteurización. El flavor más importante de estos quesos procede de FFA (ácidos grasos libres) de cadena corta y media (Nàjera y col., 1993). El fuerte olor de estos compuestos contribuye al aroma lipolizado del queso (Chàvarri y col., 1999; Fox y Wallace, 1997; House y Acree, 2002; Kalantopoulos, 1993; Macedo y Malcata, 1996; Sousa y Malcata, 1997; Tavaría y col., 2004).

Finalmente la proteólisis de las caseínas suministra un rango de péptidos de pequeño y medio tamaño y aminoácidos libres, los cuales probablemente sólo contribuyen al retrogusto de la mayoría de las variedades de queso. Sin embargo, los aminoácidos libres son importantes precursores de un rango de reacciones catabólicas poco entendidas, las cuales producen compuestos volátiles esenciales para el flavor (McSweeney y Sousa, 2000).

La adición de sal al queso contribuye al flavor del queso final y regula selectivamente la actividad microbiana también, controlando el desarrollo de microorganismos indeseables (Loren y Free, 1970).

Los compuestos volátiles se analizan generalmente mediante Cromatografía de Gases (GC) unida a Espectrofotometría de Masas (MS), con un paso anterior que implica la extracción y pre-concentración de la fracción volátil. La técnica de

Microextracción en Fase Sólida (SPME) requiere solo una pequeña cantidad de muestra y permite el aislamiento de analitos volátiles a partir de matrices tanto en estado sólido, como líquido, en poco tiempo. Por esta razón, hoy en día esta técnica se usa comúnmente en la extracción de compuestos de flavor del queso (Coda y col., 2006; Guillén y col., 2004; Lecanu y col., 2002; Lee y col., 2003).

El perfil de volátiles de algunos quesos españoles hechos a partir de leche cruda de oveja, que pertenecen a Denominaciones de Origen Protegidas (DOP) han sido estudiados, como es el caso del queso Manchego (Fernández-García y col., 2002a, 2002b; Villaseñor y col., 2000), La Serena (Carbonell y col., 2002a, 2002b), Roncal (Izco y Torre, 2000), Zamorano (Fernández – García y col., 2004b), Idiazábal (Barrón y col., 2007) y Torta del Casar (Delgado y col., 2010).

Según Delgado y col. (2010), para el queso Torta del Casar, durante la maduración del queso, los ácidos carboxílicos pueden originarse a partir de las tres principales rutas bioquímicas, lipólisis, proteólisis y fermentación de la lactosa (Curioni y Bosset, 2002). Las enzimas con actividad lipolítica (esterasas, lipasas) pueden causar la liberación de ácidos de cadena lineal (ácidos butanoico, pentanoico, hexanoico, heptanoico, octanoico, decanoico y dodecanoico), mientras las enzimas proteolíticas son las responsables de la formación de ácidos de cadena ramificada (ácidos 2-methylpropanoico y 3 – methylbutanoico) mediante la desaminación de aminoácidos como valina y leucina (Curioni y Bosset, 2002). Finalmente, el ácido acético y propiónico pueden tener origen microbiano, resultado de la fermentación de la lactosa, debido a los cambios en estos ácidos que han sido asociados al crecimiento de bacterias acéticas y propiónicas (Zino y col., 2005). El origen del ácido 2,4-hexadienoico (E, E) no está claro. Los microorganismos involucrados en la formación de los esteres son principalmente levaduras (Molimard y Spinnler, 1996), aunque también pueden ser responsables algunas bacterias lácticas y Micrococaceas, así como reacciones químicas (Gripon y col., 2001). La acción de estos dos últimos factores parece ser más probable en el queso Torta del Casar (Cáceres y col., 1997; Pouillet y col., 1991; 1993). Encontraron alta cantidad de etil ester, lo que contribuye probablemente al flavor general del queso Torta del Casar, dado su bajo umbral de percepción.

Parece que los esteres no han sido anteriormente aislados en otros tipos de quesos, por ello es posible que aporten notas aromáticas características al queso Torta del Casar (Delgado y col., 2010).

I.2. EL CUAJO

I.2.1. Características del cuajo

Un coagulante vegetal es aquel producto de origen vegetal cuyo componente activo presenta actividad coagulante. En las condiciones habituales de elaboración del queso, las preparaciones de estos coagulantes son capaces de provocar la desestabilización de las micelas de caseína de la leche, con formación de un gel láctico que madura y da lugar al queso final. Los quesos elaborados con coagulantes de origen vegetal presentan aromas, sabores y texturas novedosas, totalmente diferentes a los elaborados en las mismas condiciones con coagulantes de origen animal o microbiano.

Los extractos vegetales han sido usados como coagulantes en la elaboración de quesos desde tiempos remotos. La primera referencia se atribuye a Lucius Junius Columella en su tratado *De Re Rustica* (c. 50 a.C.): "...aunque puede ser cuajado con la flor del cardo silvestre o las semillas del girasol e igualmente con el líquido que fluye de la higuera" (Robinson y col., 1998).

Entre un gran número de proteasas con aplicaciones en la industria alimenticia, las proteínas aspárticas como la quimosina (EC 3.4.23.4) son usadas para cuajar la leche en la elaboración del queso. La coagulación de la leche se puede conseguir con un número de enzimas proteolíticas de varias fuentes, como son varios animales (pepsinas de cerdo, vaca y pollo) y especies microbianas (*Rhizomucor miehei*, *R. pusillus*, y *Cryphonectria parasitica*). El interés por los coagulantes vegetales está creciendo, debido a que el uso de los coagulantes animales puede estar limitado por su alto precio, por razones religiosas (Judaísmo, Islam), la dieta (vegetarianos), o consumidores que rechazan los alimentos genéticamente modificados (alemanes, holandeses y franceses prohíben el uso de cuajo animal modificado genéticamente (quimosina)). (Egito y col., 2007).

La mayoría de los quesos producidos en el mundo se elaboraban de forma tradicional, y en muchos casos, es así como se siguen elaborando, usando un coagulante enzimático, extraído del estómago de terneros amamantados. Este cuajo presenta dos enzimas proteolíticas, quimosina, en mayor proporción (88-94 % de la actividad coagulante sobre la leche) y pepsina bovina (EC 3.4.23.1, 9-12 % actividad coagulante sobre la leche). La principal función de la quimosina en el proceso de elaboración del queso es coagular la leche, mediante la hidrólisis del enlace Phe₁₀₅-Met₁₀₆ de la proteína establecida como micela, *k*-caseína, la cual es, en muchas ocasiones, más susceptible a quimosina que otras uniones de proteínas de la leche, lo que da lugar a la coagulación de la leche (Fox y col., 2000).

La mayoría de los sustitutos del cuajo animal son más proteolíticos y menos activos en cuanto a su actividad coagulante. Es bien conocido que estos aspectos no solo disminuyen el rendimiento del queso y la retención de proteína y grasa por la cuajada, sino que también afectan a la maduración del producto y a algunas características sensoriales (Campos y col., 1990).

Se han investigado las proteasas vegetales como coagulantes de la leche, siendo la característica que comparten estas proteinasas, un segmento extra de alrededor de 100 residuos amino-ácidos, que llevan una secuencia diferente a las proteinasas de mamíferos o microorganismos (Faro y col., 1995). Las fuentes vegetales de enzimas que cuajan la leche han sido identificadas en *Benincasa cerifera* (Gupta y Eskin, 1977), *Calotropis procera* (Ibama y Griffiths, 1987; Mohamed y O'Connor, 1999), *Dieffenbachia maculata* (Padmanabhan y col., 1993), partes del fruto de *Solanum dobium* (Yousif y col., 1996), *Centaurea calcitrapa* (Tavaria y col., 1997), *Ananas comosus* (Cattaneo y col., 1994), *Carica papaya* (Cabezas y col., 1981), *Withania coagulans* (Singh y col., 1973), *Opuntia phylloclades*, *Cereus triangularis*, *Euphorbia cadudifolia*, *Ficus bengalensis*, *F. elastica*, *E. hista*, *Lactuca sativa*, siete especies de pailonáceas, los cardos *C. scolymus*, *C. humilis* y *C. cardunculus*, y *Helianthus annus* (Tavaria y col., 2001).

Las proteasas son las enzimas más importantes por su uso en industrias alimentarias, farmacéuticas o de detergentes, así como en la preparación de cuero o lana (Mantell y col., 1985). Las proteasas más ampliamente utilizadas son papaína, bromelaína y ficina, extraídas de *Carica papaya*, *Ananas comosus* y *Ficus glabra*

respectivamente. Las flores secas al aire de varias especies vegetales han sido usadas en las regiones mediterráneas para elaborar quesos desde la época romana. Los altos niveles de enzimas proteolíticas en las flores son responsables de la efectiva coagulación de la leche (Heimgartner y col., 1990).

Notable son las proteasas extraídas de las flores del cardo silvestre (*Cynara* spp.), las cuales han sido aisladas, purificadas y parcialmente caracterizadas (Faro, 1991). Las diferentes especies de *Cynara* han sido consideradas efectivos coagulantes: *C. cardunculus* (más abundante), *C. humilis* y *C. scolymus* (Barbosa, 1983; Sousa, 1993; Sousa y Malcata, 1997a, b, 1998a, b, Sousa, 1998). Aunque se ha visto que la mayoría de las preparaciones de coagulantes vegetales presentan un ratio de actividad coagulante/actividad proteolítica excesivamente bajo, lo que resulta en péptidos amargos en el queso maduro, o una actividad coagulante muy baja, que da lugar a bajos rendimientos queseros. Las dificultades experimentadas con estas preparaciones provienen de la composición única de los extractos de plantas, que contienen un complejo cóctel de enzimas, cuya actividad es difícil de controlar (Sousa y col., 2001).

Las proteinasas vegetales que contienen las flores secas de *C. cardunculus*, han sido empleadas con éxito durante muchos siglos para elaborar quesos tradicionales en la Península Ibérica (Sousa y col., 2001) y otros países del área mediterránea, a partir de leche de oveja (Barbosa y col., 1976), como por ejemplo los quesos portugueses Serra da Estrela y Sherpa (Macedo y col., 1993; Vieira de Sá y Barbosa, 1972) o los quesos españoles Los Pedroches, La Serena y Torta del Casar, así como Los Ibores (a partir de leche de cabra) y el queso de Flor de Guía (a partir de una mezcla de leche de vaca y oveja) (Fernández – Salguero y col., 1991). Los quesos obtenidos con los extractos de las flores son altamente apreciados. Debido a la alta calidad de estos quesos, existe una demanda creciente de este tipo de proteínas coagulantes (Heimgartner y col., 1990). Las flores de *C. cardunculus* son económicamente importantes en Portugal y España, debido a su tradicional uso en la elaboración de quesos de oveja altamente apreciados (Duarte y col., 2006).

Como alternativa al cuajo animal y otros tipos de cuajo, se usa el extracto crudo de los estigmas y estilos de las flores de *C. cardunculus*, siendo probablemente el cuajo vegetal de mayor éxito hasta la fecha (Lamas y col., 2001). Vieira de Sá y Barbosa (1972) fueron los primeros en estudiar las características físico – químicas y los usos

tecnológicos de *C. cardunculus* como sustituto del cuajo animal en la elaboración del queso, su extracto acuoso crudo mostraba menor actividad coagulante pero mayor actividad proteolítica que los cuajos animales comerciales. Heimgarner y col. (1990) afirmaron la existencia de tres diferentes proteinasas aspárticas (cynarasas 1, 2 y 3), cada una de ellas compuesta por una subunidad grande y otra pequeña, siendo estas proteasas glicoproteínas, que contienen unido -N residuos de manosa, mostrando una actividad máxima a pH 5,1. Algunos autores afirman que cynarasa 3 presenta similar actividad coagulante, pero mayor actividad proteolítica que quimosina. Las formas 1 y 2 son similares entre sí, y se denominan cardosina A, mientras que la forma 3 se denomina cardosina B (Faro y col., 1992).

Además la actividad proteolítica de las cynarasas parece ser menos específica que la de quimosina: estas enzimas son capaces de hidrolizar α_{s1} -caseína, β -caseína y al menos una de las γ -caseínas, teniendo mayor afinidad hacia k -caseína (menor Km) comparadas con otras enzimas que coagulan la leche (Macedo y col., 1993) y presentan una alta y específica actividad coagulante, que las hace adecuadas para elaborar quesos de pasta blanda (asociados con ligero sabor amargo y relativamente bajos rendimientos) (Tavaira y col., 2001).

Agboola y col. (2009) compararon el efecto del cuajo vegetal respecto al cuajo animal en quesos elaborados a partir de leche de vaca y comprobó, en primer lugar, que los quesos elaborados con cuajo vegetal de cardo mostraron niveles de Nitrógeno soluble en agua más altos comparado con quesos elaborados con cuajo animal. Tras 60 días de maduración se observó un gran incremento en TCASN/TN para quesos elaborados con leche normal y cuajo vegetal, aumentando a más del doble del nivel registrado a los 7 días. Estos quesos presentaron mayor nivel de N soluble en ácido fosfotungstico, al cabo de los 60 días de maduración. La coagulación con cuajo vegetal de cardo dio lugar a una pasta más blanda y cremosa y un color más amarillo significativamente, aunque también fueron más amargos. Los quesos con cuajo animal fueron más duros y más adhesivos que los elaborados con cuajo vegetal de cardo. El uso de extracto de cardo conllevó a una mayor lipólisis, debido a la actividad lipolítica inherente de las enzimas proteolíticas del extracto. La hidrólisis de proteínas en quesos coagulados con cardo fue más intensa.

Veríssimo y col. (1995) establecieron que el cuajo del cardo contiene un adecuado ratio entre cardosina A y cardosina B, exhibiendo unas propiedades cinéticas apropiadas, siendo un sustituto adecuado para el cuajo animal (Picón y col., 1995; Whiteley, 2000). Los quesos fabricados con enzimas coagulantes de origen vegetal presentan características químicas, reológicas y sensoriales de mejor calidad, lo que hace que estos quesos sean más apetecibles para los consumidores (Picón y col., 1995).

En la Península Ibérica en particular, los quesos elaborados con coagulante vegetal, normalmente a partir de leche cruda de oveja, son especialmente apreciados y algunos de ellos, amparados bajo Denominaciones de Origen Protegidas (DOP). Estos quesos presentan una textura cremosa característica y exquisito flavor, ligeramente amargo en algunos casos, pero punzante cuando está maduro (Roseiro, 1996).

La recolección de flores de cardo es laboriosa y cara, por tanto la producción comercial de la planta sería requerida. Existe una patente española para la producción de polvo seco de extracto acuoso de las flores de *Cynara* sp. con el fin de obtener un producto más estandarizado. Sin embargo, no está registrado el uso de este producto por los elaboradores tradicionales (Roseiro, 2003).

Parece que el extracto de la flor de cardo no es un buen sustituto del cuajo animal para los quesos de leche de vaca, debido a los defectos en textura y flavor, causados por la alta actividad proteolítica de sus enzimas, resultando en pérdida de rendimiento. Este efecto no se encuentra en los quesos de leche de oveja, lo que quizás pueda deberse a una afinidad específica de este cuajo por la leche de oveja y de cabra. Barbosa (1983) sugirió la posibilidad de que las diferentes características de las caseínas ovinas y bovinas fueran un aspecto clave para la producción de péptidos amargos durante la proteólisis. Se sabe que el excesivo amargor de los quesos puede deberse a un exceso de coagulante vegetal durante la elaboración. Dado que la cantidad de coagulante añadido es normalmente empírico, el excesivo amargor es un defecto que se puede evitar con un mejor control de la elaboración (Roseiro, 2003).

I.2.2. *Cynara cardunculus*, L.

I.2.2.1. Descripción de *Cynara cardunculus*, L.

El cardo (*C. cardunculus* L.) es una especie nativa de los países mediterráneos. Comprende una subespecie, *C. cardunculus* L. subsp. *scolymus* (L.) Hegi = *C. cardunculus* L. subsp. *scolymus* (L.) Hayek (alcachofa), y dos variedades botánicas, *C. cardunculus* L. var. *atilis* DC. (cardo cultivado) y *C. cardunculus* L. var. *sylvestris* Lam. (cardo silvestre), que se considera el ancestro silvestre de la alcachofa (Foury, 1989; Rottenberg y Zohary, 1996; Raccuia y col., 2004a), dado que los cruces son completamente compatibles y sus híbridos F1 son completamente fértiles (Fernández y col., 2006).

Algunas afinidades entre el género *Cynara* y otros géneros, como *Silybum* (incluye *S. marianum*) y *Cirsium*, fueron anteriormente sugeridas (Roseiro, 2003).

Los orígenes ancestrales y geográficos del cardo y de la alcachofa han sido discutidos por varios autores: un origen del sureste de Europa para *C. cardunculus* fue propuesto por antiguos autores, como Aetheanaeus y Theophrastus, que afirmaron que el origen estaba en Sicilia. También se ha propuesto que la alcachofa apareció a partir de variedades de cardo en los jardines de los monasterios medievales. Esto concuerda con las antiguas descripciones de la elaboración de quesos en la Península Ibérica (Roseiro, 2003).

Cynara cardunculus, L., comúnmente conocido como cardo, es miembro de la familia Compositae (Asteraceae), dentro de un relativamente pequeño grupo de especies, *Cynara*, el cual comprende alrededor de 8 taxones, entre los que se incluye la alcachofa cultivada (Tutin y col., 1976; Rottenberg y Zohary, 1996). *C. cardunculus* crece de forma silvestre, en el sur y oeste de regiones del Mediterráneo, sur de Portugal, Madeira e Islas Canarias (Duarte y col., 2006).

Las plantas de cardo silvestre (*C. cardunculus*, L. var. *sylvestris* (Lamk) Fiori) son perennes, no domesticadas y robustas, completamente adaptadas a las condiciones climáticas Mediterráneas. Presenta altos y erectos tallos y hojas espinosas, agrupadas en la base de cada planta. Es una planta alógama y presenta un ciclo anual de desarrollo, en el cual su ciclo reproductivo termina en verano. La parte superior de la planta se seca en el verano, mientras que la parte enterrada en el suelo permanece viva, al igual que

ocurre en otras plantas vivaces (Fernández y col., 2006). Cuando las condiciones climáticas son más favorables las yemas de la parte basal de la planta brotan, dando comienzo a un nuevo ciclo. Esta sucesión de ciclos anuales de crecimiento puede durar varios años, más de 15 años, según Fernández y Curt (2006). La floración ocurre en el segundo año del ciclo de la planta. Las inflorescencias están organizadas como compactos capítulos, formados por numerosos floretes individuales y hermafroditas (flores). Los floretes están protegidos por un involucre ovoide – globoso, con brácteas acabadas en una espina erecta. Los floretes maduros tienen pétalos coloreados, generalmente lilas, así como un cáliz modificado en un vilano, necesario para la diseminación de las semillas. La corola se compone de 5 pétalos fusionados por sus extremos (simpétala), formando un tubo alrededor de estambres sin anteras que encierran el estigma y estilo (Sampaio, 1947; Tutin y col., 1976).

Los floretes de *C. cardunculus* poseen estigmas papilados muy largos del tipo seco. Estos estigmas muestran dos ranuras longitudinales, señal de la fusión de dos carpelos, que ocurrió a lo largo de la evolución de las Asteraceae (Raven y col., 1999). Se distinguen cuatro regiones estructurales diferentes en los estigmas del cardo: la epidermis papilada externa, la región subepidérmica con varias capas parenquimáticas, un área con tejido de apoyo, rodeando los haces vasculares, y más internamente, el tejido de transmisión. La epidermis papilada externa, densamente colocada y con forma de cerilla, es unicelular y compone la epidermis uniseriada de este órgano. En las últimas etapas de maduración, el estigma se alarga, la epidermis papilada se expande y los tejidos de apoyo y vasculares se diferencian completamente (Duarte y col., 2006).

Los estilos de las flores de *C. cardunculus* son del tipo sólido. A diferencia del estigma, se trata de una estructura cilíndrica fusionada, sin ranuras. El estilo está formado por una única capa de epidermis con una cutícula espesa, rica en lípidos y azúcares, rodeando varias capas de células vacuoladas del parénquima cortical. Las células prismáticas de la epidermis presentan grandes vacuolas, que no acumulan grandes cantidades de proteínas. El centro de esta estructura está ocupado por haces vasculares y tejido de transmisión (Duarte y col., 2006).

I.2.2.2. Otros usos de *Cynara cardunculus*

Hasta hace relativamente poco tiempo no existían referencias respecto a la composición de las flores de *Cynara* sp., que es la única parte de la planta usada como coagulante (Roseiro, 2003). *C. cardunculus* (alcachofa) contiene flavonoides (varios glicosidos a partir de apigenina, luteolina y naringenina) (El-Ansari y col., 1988; El-Negoumy y col., 1987). En cambio, las flores de *C. cardunculus* (cardo) contienen esteroides y triterpenoides pentacíclicos (Grancai y col., 1992), 1,5-ácido dicafeoylquinico (cynarin) (Grancai y col., 1994), apigenin-7-methylglucoronide chlorogenic acid (Mucaji y col., 200), saponinas (Mucaji y col., 2001) y 29 compuestos incluyendo ácidos, esteroides, aldehídos, hidrocarburos y alcoholes (Mucaji y col., 2001).

Al igual que la alcachofa, las cabezas inmaduras del cardo, así como los peciolos y las raíces, adecuadamente preparados, son comestibles. Estudios previos han mostrado que el cardo silvestre es también una prometedora fuente de aceite de semillas para la alimentación animal. Tanto el cardo silvestre como el cultivado, son una fuente de biofármacos. Las raíces contienen inulina, un mejorador de la flora intestinal, mientras que las hojas son una fuente de compuestos antioxidantes y poseen actividad antibacteriana (Portis y col., 2005), debido a su composición fenólica, pero también surge como una buena fuente de polifenoles saludables por su actividad antioxidante (Falleh y col., 2008). Recientemente se ha incrementado el uso de sus compuestos polifenólicos en cosmética (Lupo, 2001; Peschel y col., 2006).

Las aplicaciones tradicionales de *C. cardunculus* comprenden el uso de las hojas escaldadas, los carnosos peciolos de las hojas, y el receptáculo, en sopas, estofados y ensaladas (do Amaral Franco, 1976; Fernández y col., 2006; Grieve, 1971). Este cardo se usa tradicionalmente como agente diurético, colerético, cardiotónico y antihemorroidal (Koubaa y col., 1999). Las hojas del cardo son usadas para el tratamiento de dispepsia y como antidiabético (Koubaa y col., 1999; Paris y Moyses, 1971).

Las plantas de *Cynara cardunculus* ofrecen un amplio espectro de usos para biomasa diferentes, desde la utilización de la biomasa lignocelulósica para producción de energía alternativa, mediante combustión, pirolisis y gasificación (González y col., 2004a; Ochoa y Fandos, 2004), para pulpa de papel (Gominho y col., 2001) o para combustión de pellet de residuos de biomasa para calefacción doméstica (González y

col., 2004b). Los frutos de las plantas pueden ser usados de diferentes formas, como por ejemplo para alimento de rumiantes o para producción de aceite (Raccuia y col., 2007). Esta última posibilidad se debe al hecho de que este aceite se caracteriza por un ratio óptimo de ácidos insaturados (5,7), un ratio equilibrado linoleico/oleico (en torno a 1,8) y la ausencia de ácido erúico. El aceite contiene altos niveles de α -tocoferol, lo que aporta estabilidad frente a la oxidación. Estas características hacen que este aceite sea adecuado para el consumo humano. Tras la extracción del aceite de la semilla, la harina residual puede ser empleada como alimento animal, debido a la cantidad y calidad de sus proteínas (Maccarone y col., 1999).

I.2.3. Caracterización del cardo usado como cuajo vegetal

En el suroeste de la península ibérica se han empleado coagulantes vegetales para la elaboración de quesos artesanales, preparados a partir de los estilos y estigmas de las flores de *C. cardunculus*, L. y ocasionalmente con aquellos de *C. humilis*, L. (Esteves y col., 2002).

Según los Reglamentos de algunas Denominaciones de Origen de quesos, como por ejemplo Queso de La Serena, Serra da Estrela (Portugal) o Torta del Casar, el cuajo vegetal empleado debe proceder de la flor del cardo *Cynara cardunculus*. Sin embargo, las flores recogidas en el campo por diferentes recolectores pueden contener mezcla de flores de *C. cardunculus* y *C. humilis*, e incluso podrían estar contaminadas por otras especies como *Centeurea calcitrapa* y *Silybum marianum* (Sanjuán y Fernández-Salguero, 1994).

Uno de los problemas relacionados con el uso de cuajo vegetal en su forma natural es que su composición es muy variable debido a la variación planta-planta, que es consecuencia de diferencias agronómicas por el tipo de suelo y condiciones climáticas. Barbosa (1983) observó esta variabilidad en la composición de las flores secas de cardo entre lotes y años. Las variaciones a nivel microbiológico, y químico, entre las muestras de flores de cardo puede contribuir a la variabilidad en las características entre quesos de la misma variedad. La variación en la humedad de las flores es otro factor de la variabilidad composicional (Martins y col., 1996). En la misma línea, Heimgartner y col. (1990) afirmaban que el uso de flores con diferente

contenido en enzimas proteasas, debido a la variabilidad natural y de las condiciones climáticas, implica variaciones en las características morfo-organolépticas del queso.

I.2.3.1. Caracterización Morfológica

La caracterización morfológica puede ser una herramienta para la diferenciación entre especies de cardo que podrían ser confundidas por la flor, parte recolectada para la obtención del cuajo. Para ello es necesario conocer las características botánicas que definen a cada una de las especies, especialmente aquéllas que las diferencian entre sí.

La caracterización morfológica de *Cynara cardunculus*, L. fue llevada a cabo por Valdés y col. (1987), y publicada en “Flora vascular de Andalucía Occidental”. Esta caracterización recoge los aspectos botánicos que la definen como tal especie y la diferencian de otras especies del mismo género. Este método de identificación de especies vegetales ha sido ampliamente utilizado para la clasificación botánica de las especies, pero hoy en día se dispone de otras técnicas que apoyan la caracterización morfológica tradicional, como son las técnicas de biología molecular o las técnicas basadas en el análisis de proteínas, que además permiten diferenciar entre variedades de la misma especie.

I.2.3.2. Caracterización Molecular

Los marcadores de ADN son usados, entre otros propósitos, para caracterizar variedades o cultivares, y la discriminación de fraudes alimentarios (Wolfe y Primrose, 2004). Los primeros marcadores de ADN usados en plantas fueron los análisis de las variaciones en los fragmentos generados por endonucleasas, generalmente denominados polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción ó RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Beckman y Soller, 1986). Sin embargo, los sistemas de marcadores basados en la PCR (Polimerasa Chain Reaction) resultan ser la mejor herramienta para diversos análisis genéticos. Estos sistemas de marcadores incluyen la “PCR aleatoria”, determinada por la técnica del ADN polimórfico amplificado al azar (Random Amplified Polymorphic DNA o RAPD) (Williams y col., 1990). Otras técnicas desarrolladas son el empleo de microsátélites, conocida también como repeticiones de secuencia simple o SSRs (Broun y Tanksley, 1996), secuencias entre repeticiones

simples-PCR o ISSR-PCR (Zietkiewicz y col., 1994) y análisis de polimorfismo de los fragmentos de ADN amplificado o AFLP (Amplified Length Polymorphisms) (Vos y col., 1995). Las técnicas basadas en los métodos de PCR tienen la ventaja de ser rápidas y sensibles para identificar entre especies vegetales e incluso entre variedades (Hernández y col., 2007). Algunos de estos métodos han sido empleados en el mapeo genético de la alcachofa. Se han realizado diversas evaluaciones basadas en ISSR, RAPD y AFLP en las variedades de alcachofa “Romanesco” (Pagnotta y col., 2004; Trionfetti Nisini y col., 2007), “Spinoso sardo” (Lanteri y col., 2001), “Violetto de Sicilia” (Raccuia y col., 2004; Portis y col., 2005a) y “Spinoso di Palermo” (Portis y col., 2005a) y también en cardo, tanto cultivado, como silvestre (Sonnante y col., 2004; Portis y col., 2005b, c). Donde AFLP e ISSR han sido empleados para generar huellas de ADN a partir de plantas individuales (Lanteri y col., 2004) se ha encontrado un nivel de variabilidad sustancial dentro de poblaciones morfológicamente uniformes.

Portis y col. (2005) realizaron el primer estudio sobre la variabilidad genética entre y dentro de poblaciones de cardo silvestre (*Cynara cardunculus*) de Cerdeña y Sicilia, mediante SSR. Previamente, Raccuia y col. (2004) analizaron la variación genética de seis poblaciones de Sicilia mediante marcadores AFLP.

1.2.3.3. Caracterización mediante análisis de proteínas

Varios trabajos han descrito métodos basados en patrones de proteínas para el control de calidad de los alimentos (Bietz, 1994; Cancalon, 1995; Hernández y col., 2007; Serradilla y col., 2008). Los análisis de proteínas en estas matrices complejas se realizan hoy en día, principalmente mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) sodio dodecil sulfato, y por cromatografía líquida de alta resolución y fase reversa (RP-HPLC).

La técnica SDS-PAGE es actualmente empleada como un proceso adecuado y eficiente para evaluar y monitorizar la degradación de proteínas, además permite determinar el peso molecular de las proteínas y sus hidrolizados (Barros y Malcata, 2006). Se utiliza para proteínas y péptidos de peso molecular alto. En dicha electroforesis las proteínas se separan en base exclusivamente al tamaño de sus subunidades (Weber y Osborn, 1969). Esto es debido a que se utiliza un detergente aniónico, dodecil sulfato sódico (SDS) y un agente reductor, como el 2-β-

mercaptoetanol, que disocian las moléculas proteicas, rompen los puentes disulfuro y cargan las subunidades negativamente. Esta técnica se basa, en la aplicación de un voltaje alto sobre el capilar relleno de un gel de poliacrilamida. Las matrices sólidas más utilizadas son las discontinuas, en las que hay dos geles, uno concentrador con gran tamaño de poro (normalmente con un 4% de acrilamida) y otro separador con menor tamaño de poro (Laemmli, 1970). Esta técnica se caracteriza por la pequeña cantidad de muestra necesaria para su realización, así como la posibilidad de un análisis cuantitativo directo de los componentes de la muestra. En contraposición, esta técnica requiere muchos pasos manuales, preparación del gel, colocación del gel en el aparato de la electroforesis, inyección de la muestra, retirar los geles de los moldes, teñir y desteñir los geles, etc. (Bietz, 1994). Además para cuantificar las proteínas teñidas se necesitan otros pasos manuales para la densitometría o análisis de imagen del gel teñido.

La electroforesis capilar (CE) puede ser un método alternativo, dado que ofrece una serie de ventajas sobre la técnica SDS-PAGE, como que es un método de análisis más rápido, detección, cuantificación en columna, y una mayor eficiencia y resolución (Cancalon, 1995; Manabe, 1999). Además, el método CE conlleva un método de extracción de proteínas sencillo y necesita pequeñas cantidades de solventes orgánicos en comparación con la técnica RP-HPLC. Una categoría de la electroforesis capilar (CE) es la electroforesis capilar en zona (FZCE), que ha sido aplicada en el análisis de sistemas complejos de proteínas. Hernández y col. (2006; 2007) utilizaron y optimizaron la técnica FZCE para la detección de pimentón fraudulento (adulterado) elaborado a partir de las variedades de pimiento Papri Queen, Sonora y Papri King. Así mismo, esta técnica fue eficaz para determinar el proceso de secado en la elaboración del pimentón, a partir de las variedades de pimiento autóctonas. Como consecuencia de estos estudios, esta técnica se propuso como herramienta para el control de calidad rutinario del “Pimentón de la Vera”. Por su parte, Serradilla y col. (2008) utilizaron la técnica FZCE como método de autenticación de variedades de cereza tipo “Picota” del Valle del Jerte, que además proporcionaba información acerca de los parámetros físico-químicos más relevantes relacionados con la calidad sensorial del fruto. De modo que este método se propuso como técnica a emplear en los controles de calidad rutinarios que lleva a cabo la DOP “Cereza del Jerte”.

En la última década, CE ha demostrado ser una eficiente técnica de separación para el análisis de proteínas en los alimentos en general (Recio y col., 2001) y de

proteínas de la leche en particular (Recio y col., 1997). Esta técnica, CE, ha sido empleada para monitorizar la proteólisis en quesos (Otte y col., 1999), principalmente en quesos de vaca, pero también en quesos de oveja y cabra (Cattaneo y col., 1996). También ha sido utilizada para estudiar la proteólisis en quesos elaborados con cardo vegetal (*Cynara L.*) (Roseiro y col., 2003).

I.2.4. Obtención del cuajo para la elaboración de la “Torta del Casar”

Los extractos acuosos se preparan a partir de los estigmas y estilos de las flores de *Cynara cardunculus*, que se recolectan y secan a la sombra, al aire libre. Los extractos de *C. humilis* se utilizaban también en la fabricación de quesos de oveja (Fernández – Salguero y Sanjuán, 1999; Vioque y col., 2000). Las proteinasas presentes en estas flores se llamaron inicialmente cyanrasas, y actualmente se denominan cardosinas (Heimgartner y col., 1990; Faro y col., 1992).

El coagulante de *C. cardunculus* contiene dos enzimas, cardosina A y cardosina B (Esteves y col., 1995), siendo ésta más proteolítica que cardosina A. Ambas enzimas hidrolizan el enlace Phe₁₀₅-Met₁₀₆ de k-caseína. Los parámetros cinéticos de cardosina A son similares a aquellos observados para quimosina y los valores de cardosina B fueron similares a los de pepsina, cuando un péptido fue usado como sustrato (Veríssimo y col., 1995).

Las proteasas encontradas en *Cynara humilis* son diferentes a las de *Cynara cardunculus*, no solo porque *C. humilis* solo contiene cardosina A, sino también en términos de actividad coagulante (Fernández-Salguero y col., 1997).

Las cardosinas exhiben una preferencia por enlaces entre aminoácidos hidrofóbicos de α _{s1}-caseína bovina (Ala₁₆₃-Val₁₆₇) y β -caseína (Ala₁₈₉-Tyr₁₉₃), el cual es menos susceptible al ataque de quimosina (Queiroz-Macedo y col., 1996).

I.2.5. Enzimas presentes en las flores de “*Cynara cardunculus*”

Las proteinasas vegetales son interesantes por ser productos naturales que pueden ser extraídas fácilmente mediante una infusión acuosa. Las proteinasas que aparecen en las flores secas de *C. cardunculus* son proteinasas aspárticas (EC 3.4.23),

también conocidas como pepsinas ácidas o aspartil proteinasas, constituyen una de las 4 subfamilias de enzimas proteolíticas, pertenecen a la familia de las endopeptidasas, muestran un pH óptimo ácido para la actividad enzimática (5,1), son inhibidas por la pepstatina A, y están ampliamente distribuidas en variedad de organismos como algunos vertebrados, plantas, virus y retrovirus, algunas bacterias, hongos y levaduras (Barros y col., 2004). Están involucradas en un número de procesos fisiológicos y patológicos, como digestión (pepsina y quimosina) (Chow y Kassell, 1968; Foltmann, 1992), infección retroviral (proteína del virus de la inmunodeficiencia humana) (Huff, 1991), proteólisis intracelular y degradación de la matriz extracelular (Dingle y Leaback, 1975) y la liberación del péptido β -amiloide del precursor amiloide en la enfermedad de Alzheimer (Vassar, 2004), entre otras.

Las cardosinas A y B han sido ampliamente caracterizadas a nivel molecular y bioquímico en los últimos años (Ramalho – Santos y col., 1997; 1998; Vieira, y col., 2001). Estas cardosinas son enzimas glicosiladas de doble cadena. A pesar de presentar alta homología, a nivel de nucleótidos y de aminoácidos, las cardosinas A y B están dirigidas hacia distintos compartimentos celulares en la flor (Oliveira y col., 2010).

Las proteinasas cardosinas A y B aparecen en la parte femenina de la flor de *C. cardunculus*, en la parte superior (donde el ratio de concentración de cardosina A sobre la B es más alto) y en la parte inferior, donde sólo está presente la cardosina B (Castanheira, 1998). Cardosina A está formada por dos subunidades con pesos moleculares de 31 y 15 kD, mientras la cardosina B está formada por dos subunidades de pesos moleculares 34 y 14 kD, siendo éstas enzimas parecidas, en términos de especificidad y actividad, a la quimosina y la pepsina, respectivamente (Pires y col., 1994), que son los principales componentes del cuajo animal (Esteves y col., 1995).

En el tejido del callo se detectó cardosina A (31 kDa), junto con una banda de 45 kDa y otra de 55 kDa. La banda de 45 kDa parece ser una cadena no dissociada de la enzima. Por su parte, cardosina B fue detectada mediante una banda de 64 kDa, correspondiendo al precursor, y otra banda de 55 kDa. La banda de 55 kDa de cardosina A no ha sido descrita en la literatura aún y no se ha detectado en flores de cardo (Ramalho – Santos y col., 1997; Vieira y col., 2001), semillas o hojas (Pereira y col., 2008). La banda de 55 kDa puede ser una forma intermedia de cardosinas sin el prosegmento, hipótesis que se apoya por el documentado lugar de hidrólisis de

cardosina A-Arg68-Asp69, Asn309-Gly310 and Ser414-Thr415 (Ramalho – Santos y col., 1998), si bien estos estudios se han realizado con tejido de células indiferenciadas, que son distintos a los tejidos completamente diferenciados (Oliveira y col., 2010).

Cardosina A y B se localizan, a nivel intracelular, en el citoplasma, más probablemente en el retículo endoplasmático. Las cardosinas pueden estar implicadas en el metabolismo basal, como activos o inactivos precursores de moléculas, con otras funciones aparte de la proteólisis, ocurriendo el desencadenamiento de su expresión cuando aumenta el metabolismo del tejido debido a eventos de diferenciación y desarrollo (Oliveira y col., 2010).

Egas y col. (2000) proponen la idea de que los precursores de proteinasas aspárticas (PA) son moléculas bifuncionales, y pueden estar involucradas en mecanismos de defensa de las plantas y/o actuando en el proceso de muerte celular. La procarnosina A, precursor de cardosina A, sufre un proceso proteolítico cuando la flor madura (Egas y col., 2000; Simões y Faro, 2004). El precursor de cardosina A (64 kDa) fue detectado en el embrión. Una banda de 45 kDa fue también detectada y corresponde a una forma intermedia de la proteína, descrita por Ramalho-Santos y col. (1998). La forma intermedia de cardosina B (37 kDa) fue detectada en el embrión durante las primeras etapas tras la imbibición y disminuye tras 72 – 84 h hasta hacerse casi indetectable. Cardosina B es indetectable en la semilla en cualquier estado de desarrollo (Pereira y col., 2008).

Las proteinasas aspárticas pueden estar implicadas en la reorganización de la membrana y la transformación lipídica necesaria para la toma de agua, reorganización de los tejidos, el crecimiento de la radícula y el cotiledón y la senescencia durante la germinación de las semillas, además de en su actividad proteolítica y/o proceso de reserva de proteínas de las semillas. La síntesis de novo de la cardosina A ocurre en el momento de la emergencia de la radícula, quizás en respuesta a una señal de desarrollo. De forma diferente a otros zymogens, las procarnosinas son activas y pueden tener función en la proteólisis (Simões y Faro, 2004). Ambas formas, el precursor y la forma madura, pueden presentar diferentes funciones en la germinación de las semillas, lo cual se apoya en su diferente localización (Pereira y col., 2008).

La forma madura de cardosina B (34 kDa) fue detectada desde las primeras etapas, tras la imbibición hasta la emergencia de la radícula, lo que sugiere que se

originó de los tejidos ováricos, por lo que parece que esta enzima es resistente a la proteólisis a lo largo de la maduración y desecación de las semillas. La cardosina B está también presente en semillas desarrolladas, y tras la rehidratación, es activada y actúa relajando las estructuras antes de la emergencia de la radícula (Pereira y col., 2008). En los sacos embrionarios completamente maduros, la localización de cardosina B está relacionada con el programa de muerte celular en la nucela de *C. cardunculus*, lo que sugiere su implicación en el desarrollo del óvulo y el saco embrionario (Figuereido y col., 2006).

Juntas, cardosinas A y B, actúan durante el desarrollo postembrionario de la semilla en diferentes momentos, realizando diferentes funciones: mientras cardosina B es importante para la movilización de proteínas de almacenamiento antes de la emergencia radicular, cardosina A es sintetizada de novo en ese momento e incrementa después (Pereira y col., 2008; Oliveira y col., 2009). De este modo se pone de manifiesto la idea de que la expresión de de las cardosinas y sus roles fisiológicos están asociados con órganos y tejidos de alta actividad metabólica (Oliveira y col., 2010).

La mayoría de las proteínas solubles en estigmas maduros son cardosinas, y la abundancia de proteasas en las flores de una planta es inusual. Las proteasas aspárticas de las plantas identificadas son vacuolares o secretadas, y las cardosinas A y B son un ejemplo de esta variedad. Cardosina A es una proteína vacuolar presente en el papillae estigmático maduro, mientras que la cardosina B es secretada y principalmente localizada en la pared celular y la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo, aunque también se encuentra en la parte inferior del estigma. Cardosina A está presente de forma abundante en el estigma a lo largo del desarrollo de la flor, principalmente en el papillae estigmático, pero también en las capas parenquimales subepidérmicas, siendo detectadas en estigmas recogidos en inflorescencias tanto abiertas, como cerradas. En el papillae epidérmico de los estigmas cardosina A es evidente y está específicamente localizada en las vacuolas de almacenamiento de proteínas del tipo *electron-dense*. Cardosina A también está presente en la epidermis del estilo, pero en mucha menor cantidad (Duarte y col., 2006).

Debido a la localización de cardosina A en la flor, parece razonable pensar que participa en los eventos de reconocimiento del polen, ya que este proceso, en este tipo de plantas, se da a nivel del estigma. Faro y col. (1999) demostraron que cardosina A

contiene un tema Afg-Gly-Asp (RGD), una secuencia bien conocida, a través de la cual ocurre la interacción de los receptores del polen. Por otra parte, la acumulación de cardosina A en las flores maduras de *C. cardunculus* puede indicar la participación de esta proteinasa aspártica en la senescencia de este órgano (Ramalho – Santos y col., 1997; Simões y Faro, 2004). En cuanto a cardosina B, debido a su localización específica a lo largo del tejido de transmisión del estilo durante la maduración de la flor, podría ser responsable del proceso de ensanchamiento o relajación del tejido de transmisión de ECM para facilitar el crecimiento del tubo polínico. Es posible, por tanto, que las cardosinas estén implicadas en la reproducción sexual de *C. cardunculus*. El hecho de que las cardosinas estén localizadas en diferentes partes de la flor de *C. cardunculus* apoya la idea de que estas proteinasas tienen funciones biológicas diferentes (Duarte y col., 2006).

Oliveira y col. (2010) especularon que en el tejido caloso podría existir otro tipo de cardosina B, una proteinasa como la cardosina B (*cardosin B-like*), aunque no está bien descrita. De igual forma, Pimentel y col. (2007) aislaron dos nuevos genes de las flores de *C. cardunculus* que codifican para las cardosinas C y D, las cuales comparten gran similitud con cardosina A, siendo por ello denominadas *cardosin A-like*. No es sorprendente la existencia de muchos tipos de cardosinas, dado que están codificados por una familia multigénica, y es probable que en diferentes órganos o tipos de células existan diferentes tipos de cardosinas, en función de las necesidades celulares.

Las cardosinas A y B representan las proteasas aspárticas de flores mejor caracterizadas, junto con las cyprosinas (Cordeiro y col., 1994), otras dos proteinasas aspárticas presentes en los pistilos de *C. cardunculus* L. Cardosinas y cyprosinas no han sido copurificadas hasta ahora y su coexistencia en la planta aún parece difícil de conseguir (Oliveira y col., 2010). Las secuencias de amino ácidos deducidos de las cardosinas C y D revelan que ambas enzimas poseen la típica estructura de organización dominante en las proteinasas aspárticas vegetales (Simoes y Faro, 2004). La tipología del grupo de proteinasas aspárticas procedentes de la familia Asteraceae sugiere que, en algún momento de la evolución de *C. cardunculus*, un gen ancestro de las proteinasas aspárticas se duplicó y dio lugar a las ramas que comprenden cyprosinas y cardosinas (Pimentel y col., 2007).

Pimentel y col. (2007) demostraron que los genes de las cardosinas A y D comparten un patrón de expresión similar, siendo ubicuamente expresados, el gen de expresión de cardosina B es específico del pistilo, y el de cardosina C es específico de la flor y se restringe al polen y a los pistilos de los capítulos parcialmente abiertos. Cardosinas y cyprosinas comparten una estructura de organización dominante similar y muestran un alto grado de identidad en términos de estructura primaria. Contrariamente a las cyprosinas, las cardosinas no contienen los residuos Lys11/Tyr13 en el dominio N-terminal. Estos residuos están bien conservados entre las proteinasas aspárticas vegetales, y están involucrados en la inactivación del mecanismo de la forma precursora de las enzimas.

Las cardosinas y las proteinasas aspárticas presentes en *Cynara humilis* son las únicas proteinasas aspárticas vegetales conocidas hasta la fecha, que no contienen estos residuos en la estructura primaria, una característica que puede explicar la actividad enzimática que exhiben las procardosinas recombinantes (Oliveira y col., 2010).

La presencia de una familia de multigenes que codifica las proteinasas aspárticas en *Cynara cardunculus*, L. (Pimentel y col., 2007) sugiere que existan otras proteasas. De hecho, Sarmiento y col. (2009) identificaron y caracterizaron cinco proteasas más a partir de los pistilos de *C. cardunculus*, de modo que ya serían nueve las proteasas aspárticas presentes en esta planta. Esto supone uno de los más altos números de proteinasas aspárticas purificadas de un solo organismo, lo que concuerda con una específica e importante función biológica de estas proteínas dentro de *C. cardunculus*. Las cardosinas E, F, G y H son diméricas, con dos subunidades glicosiladas, con peso molecular de 29 y 15 kDa, sensibles a pepstatin, activas a pH ácido, con un máximo de actividad a pH 4,3. Las cardosinas E, F, G y H se parecen más a cardosina A que a cardosina B o cyprosinas. Las cardosinas E y G son más activas que la cardosina A. En cuanto a su especificidad, parece que cardosina E muestra diferente especificidad que cardosina A (Sarmiento y col., 2009).

I.2.6. Actividad proteolítica del cuajo obtenido de *Cynara cardunculus*

En la degradación de la matriz proteica de la cuajada participan principalmente las enzimas proteolíticas de *C. cardunculus*, aunque también participan las enzimas

propias de la leche y de la población microbiana presente en el queso (Baer y Collin, 1993; Macedo y Macalta, 1997; Sousa y col., 2001).

Estudios realizados sobre la especificidad y cinética en la cadena de oxidación de la insulina mostraron que la cardosina A tiene una especificidad de hidrólisis similar a la quimosina, mientras que la cardosina B se asemeja a la pepsina (Faro y col., 1992; Veríssimo y col., 1995; Ramalho-Santos y col., 1996). Las enzimas de los extractos de las flores secas de *C. cardunculus* hidrolizan el enlace Phe₁₀₅-Met₁₀₆ de *k*-caseína (Faro y col., 1992; Macedo y col., 1993b; Sousa y Malcata, 1998b), primera fase de la coagulación enzimática (Silva y Malcata, 2005), generando dos fragmentos polipeptídicos; la *para*- κ -caseína insoluble y el glicomacropéptido soluble que se separa de la estructura micelar y pasa al suero. Estos péptidos de elevado tamaño procedentes de las κ -caseínas, junto con las demás proteínas de la leche, son degradados posteriormente durante la etapa de maduración del queso. Bajo ciertas condiciones (pH 6.5, 5.5 en ausencia de NaCl, y a pH 5.2 con 5 % NaCl) el principal lugar de rotura de las proteinasas de *C. cardunculus* fue Phe₂₃-Val₂₄ para α_{s1} -caseína ovina, si bien estas proteinasas son capaces de producir la escisión de 9 enlaces, Phe₂₃-Phe₂₄, Tyr₁₅₃-Tyr₁₅₄, Trp₁₆₄-Tyr₁₆₅, Tyr₁₆₅-Tyr₁₆₆, Tyr₁₆₆-Val₁₆₇, Phe₁₄₅-Tyr₁₄₆, Leu₁₄₉-Phe₁₅₀, Leu₁₅₆-Asp₁₅₇ y Ala₁₆₃-Trp₁₆₄, actividad mayor que la descrita para la quimosina sobre la α_{s1} -caseína bovina (Macedo y col., 1996), mientras que α_{s2} -caseína ovina y caprina se escinde por los enlaces Phe₈₈ – Tyr₈₉ y Ser₉-Ser₁₀ (Sousa y Macalta, 1998). Respecto a β -caseína ovina, las proteinasas de *C. cardunculus* las hidrolizan principalmente por Leu₁₂₇-Thr₁₂₈ y Leu₁₉₀-Tyr₁₉₁, a pH 6.5 o 5.5 en ausencia de NaCl, y a pH 5.2 con 5 % NaCl (Sousa y Malcata, 1998b).

Merece la pena resaltar que las proteinasas de *C. cardunculus* escinden todos los enlaces de ciertas regiones extremadamente hidrofóbicas de α_{s1} -caseína (Ala₁₆₃-Trp-Tyr-Tyr-Val₁₆₇) y de β -caseína (Ala₁₈₉-Phe-Leu-Leu-Tyr₁₉₃), mientras que quimosina solo hidroliza el enlace Trp₁₆₄-Tyr₁₆₅ en esta región de α_{s1} -caseína y en los vínculos Ala₁₈₉-Phe₁₉₀ y Leu₁₉₂-Tyr₁₉₃, en estas regiones de β -caseína. Esto sugiere que las proteinasas de *C. cardunculus* manifiestan una mayor preferencia por enlaces entre voluminosos residuos hidrofóbicos que la quimosina (Macedo y col., 1996). La hidrólisis de β -caseína bovina por quimosina (Fox y Walley, 1971) y por las proteinasas de *C. cardunculus* (Sousa, 1993) es fuertemente inhibida al 5 % NaCl y completamente inhibida al 10 % de NaCl, pero el efecto es debido a un cambio de sustrato más que a la

enzima, lo cual demostraron algunos autores (Kelly y col., 1996; Kristiansen y col., 1999) en queso, de modo que los quesos no salados presentaban menos cantidad de β -caseína intacta que los quesos salados, y que el fragmento C-terminal de β -caseína, β -CN (f193-209), el cual es amargo y producido por quimosina, se formó solo en los quesos no salados.

Roa y col., (1999) encontraron que las degradaciones primarias que afectan a las caseínas en quesos elaborados con los extractos de *C. cardunculus*, como el queso de La Serena, son principalmente debidas a la acción residual de este cuajo, produciendo péptidos de medio tamaño a partir de las primeras caseínas, estos después se degradan en péptidos más pequeños y finalmente en amino ácidos, en un proceso conocido como segunda proteólisis. La primera proteólisis juega un papel esencial en el desarrollo de la textura del queso, mientras que la segunda proteólisis está implicada con el flavor del queso, de ahí la gran importancia de asegurar un equilibrio en la rotura de las caseínas, con el fin de prevenir el desarrollo de indeseables atributos en el queso, como baja viscosidad y alto amargor (Visser, 1993).

La actividad proteolítica y coagulante de los extractos de cardo fue estudiada por primera vez por Christen y Virasoro (1935). Ellos determinaron que la actividad enzimática se encontraba sólo en la flor (estilos y estigmas de la inflorescencia) y que esta actividad se mantiene hasta 70° C. Investigaciones posteriores confirmaron estos resultados (Vieira de Sá y Barbosa, 1972; Tsouli, 1974).

Roa y col. (1999) observaron como las enzimas de *C. cardunculus* generaban mayor proteólisis sobre las α -caseína que sobre las β -caseínas en el queso de La Serena. Por otra parte, las proteinasas de la flor del cardo también han manifestado actividad sobre las proteínas del lactosuero como la α -lactoalbumina y la β -lactoglobulina, formando péptidos de mayor digestibilidad y funcionalidad, que influyen además sobre la textura y el sabor de los quesos (Lamas y col., 2001).

La actividad proteolítica del extracto de las flores del cardo es extremadamente variable, dependiendo de la variedad, el estado de maduración, la parte de la flor (máxima actividad proteolítica se asocia con las proteasas del estilo), el tiempo de secado y el contenido final de humedad (Macedo y col., 1993). Según Esteves y col. (1995) el proceso de secado de las flores del cardo para la preparación del cuajo provoca una disminución de la actividad proteolítica del cuajo, en particular la actividad

asignada a cardosina B, dado que es la enzima con la actividad proteolítica más fuerte en la flor del cardo. Dicho proceso por tanto, afecta a la actividad proteolítica global del cuajo.

La presencia de iones de sal puede ser determinante en el aumento de la actividad proteolítica del extracto y el proceso de coagulación de la leche (Sales-Gomes y Lima-Costa, 2008). Heimgartner y col. (1991) y Campos y col. (1990) observaron el efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica, confirmando que la actividad proteolítica aumenta con la temperatura hasta un máximo de 37° C. El tiempo de coagulación, por tanto, disminuye al aumentar la temperatura.

Según Veríssimo y col. (1995) se establece una relación inversa entre actividad proteolítica y actividad coagulante. Alta actividad proteolítica del extracto corresponde generalmente a tiempos bajos de actividad coagulante (Sales-Gomes y Lima-Costa, 2008).

Se ha descrito que la mayoría de las plantas poseen un ratio excesivamente bajo de actividad coagulante frente a actividad proteolítica, lo cual, probablemente conlleva a péptidos amargos en queso maduro, o a una fuerza de cuajado excesivamente baja que produce quesos con muy poco rendimiento (Sousa y col. 2001).

La actividad proteolítica de las cardosinas ha sido determinada por muchos autores, utilizando diferentes sustratos para ser degradados por dichas proteinasas. Así Barros y Malcata (2004) estudiaron la digestión de azocaseína por parte de cardosina A y su cuantificación se basó en la cantidad de péptidos liberados, mediante absorbancia a 440 nm, del mismo modo emplearon la técnica SDS-PAGE para estudiar la hidrólisis de las proteínas del lactosuero. Campos y col. (1990), Esteves y col. (2005) y Egito y col. (2007) también utilizaron estas técnicas para estudiar la hidrólisis de las caseínas. Otras técnicas empleadas con el mismo fin son CE (electroforesis capilar) (Hwei Low y col. 2006), HPLC (Egito y col., 2007), RP-HPLC (Pina y col., 2003). Tavaira y col. (2001) determinaron la actividad proteolítica global utilizando como sustrato Na-caseinato ovino y caprino, frente a una solución de enzimas procedente del extracto de *C. cardunculus*, midiendo la absorbancia a 280 nm (Campos, 1990). La actividad proteolítica específica de este extracto fue determinada mediante la técnica UREA-PAGE, expresando en % la degradación de las caseínas. Trujillo y col. (2000) también emplearon UREA-PAGE con el mismo fin.

Según Marcos y Serrano (1980) la proteasa de la flor de *C. humilis*, a pesar de tener una actividad coagulante ligeramente inferior a la de la renina, en mucho más proteolítica que la renina. Vierira de Sá y Barbosa (1972) también comprobaron que el extracto de la flor de *C. cardunculus* era más proteolítico que el cuajo animal a igual actividad coagulante. La excesiva actividad proteolítica del cuajo vegetal puede resultar inconveniente desde el punto de vista práctico, por su efecto sobre la calidad del producto, permite, no obstante, el acortamiento del periodo de maduración, y puede paliarse o controlarse tecnológicamente, favoreciendo la actividad coagulante mediante la acidificación de la leche o adición de cloruro cálcico (Nielsen, 1975), y reduciendo su actividad proteolítica mediante el empleo en las salas de curado de temperatura de refrigeración (Martens y Maudts, 1973).

I.2.7. Actividad coagulante del cuajo procedente de *Cynara cardunculus*

La coagulación de la leche por medio de un cuajo es un paso esencial durante la elaboración del queso, y es el resultado de tres fases diferentes pero que se solapan: a) la hidrólisis de κ -caseína da lugar a la desestabilización de las micelas de caseínas, b) la agregación de las micelas de caseínas desestabilizadas, c) la gelificación (Dalglish, 1992). Durante la coagulación de las caseínas se forma un gel a modo de matriz, que atrapa o retiene grasa, agua y algunos componentes solubles de la leche.

La actividad coagulante ha sido atribuida a la relativamente alta concentración de proteinasas aspárticas, especialmente en los tejidos florales de *Cynara cardunculus* (Barros y Malcata, 2004). La mayor parte de la actividad coagulante que se añade a la leche se pierde en el suero, solo un máximo del 15 % de la actividad coagulante añadida a la leche permanece en la cuajada tras la elaboración, dependiendo de factores como el tipo de coagulante, el ratio de diferentes enzimas en mezclas, la temperatura durante la elaboración, la variedad de queso y el nivel de humedad en el queso final (Guinee y Wilkinson, 1992).

Según Irigoyen y col. (2000) la actividad coagulante del cuajo empleado es uno de los factores que tiene mayor importancia en la degradación de las caseínas, similarmente el origen de la enzima coagulante usada (animal, microbiana o vegetal) puede condicionar el nivel de proteólisis, de modo que las enzimas vegetal y microbianas rompen β - caseína más rápido que las enzimas animales.

La actividad coagulante está relacionada con la habilidad de la enzima para romper o hidrolizar κ -caseína en la región del péptido Phe₁₀₅-Met₁₀₆, que es específico en el proceso de elaboración del queso. Según los resultados de Campos y col. (1990), el extracto de cardo muestra una especificidad más amplia y ataca varios péptidos unidos, lo que significa que presenta un menor ratio de actividad coagulante relativa/actividad proteolítica. Por tanto, deberían introducirse modificaciones en el pH y la temperatura para mejorar las condiciones de coagulación durante la elaboración de queso.

El primer paso de la elaboración del queso es la coagulación de la leche, lo cual implica la unión mediada enzimáticamente de κ -caseína al péptido Phe₁₀₅-Met₁₀₆. Además de esta actividad coagulante, las enzimas del cuajo se quedan atrapadas en la cuajada, donde provocarán la ruptura de proteínas durante la maduración del queso (Dalglish, 1987, Fox, 1989) y por tanto, son las responsables de la liberación de varios péptidos con funciones bioquímicas, reológicas y sensoriales en el queso (Dalglish, 1987).

La actividad coagulante disminuye cuando aumenta la temperatura de la leche disminuye cuando aumenta el pH de la leche, aumenta al aumentar la concentración enzimática, aumenta con mayores concentraciones de calcio.

La actividad coagulante de las cynarasas presentes en las flores de *C. cardunculus* sobre la leche, las convierte en enzimas adecuadas para elaborar quesos de pasta blanda, y se asocian con sabores amargos y bajos rendimientos relativamente (Tavaria y col., 2001). Desde el siglo XIX varias metodologías han sido empleadas para caracterizar la actividad coagulante sobre la leche, estando la mayoría de ellas basadas en la observación de la formación de la cuajada sobre un sustrato de leche (Soxhlet, 1877; Berridge, 1952). Sin embargo, estos métodos carecen de la definición de la actividad coagulante total (Andrén, 1998), lo cual ha sido adecuadamente solucionado por el IDF Standard 157^a: 1997.

Sousa y Malcata (1998) definieron la actividad coagulante en base a Unidades de Coagulación (RU), de modo que una unidad coagulante (RU) se define como la cantidad de extracto necesaria para coagular 10 ml de leche a 30° C durante 100 segundos. Por su parte, Chazarra y col. (2007) definieron una unidad de fuerza del cuajo

o actividad coagulante (RS) como el número de volúmenes de leche coagulada por cada volumen de cuajo en 40 minutos a 35° C.

I.2.8. Actividad antimicrobiana de *Cynara cardunculus*

Algunas investigaciones han mostrado la presencia de saponinas, lactonas sesquiterpénicas, flavonoles, esteroides, cumarinas, etc., en las hojas y semillas de *C. cardunculus* (Koubaa, y Damak, 2003; Pinelli y col., 2007; Sevcikova y col., 2002; Valenteo y col., 2002). En las brácteas involucrales se han identificado esteroides, de saponinas triterpenoides, cumarinas, flavonoides y derivados del ácido cafeico (Mucaji y col., 2000). Los extractos acuosos liofilizados de las hojas del cardo presentan actividad antioxidante y contra los radicales superóxido (Valentao y col., 2002). Los ácidos mono- y dicafeoil-quinico, que están presentes en los extractos de cardo muestran actividad anti-HIV integrasa (Slanina y col., 2001). Las saponinas triterpenoides aisladas de las brácteas involucrales de *C. cardunculus* reducen la mutagénesis inducida químicamente in vitro (Krizkova y col., 2004). Además los extractos de las hojas de *C. cardunculus* previenen la pérdida de la función vasomotor, asociada a la edad (Rossoni y col., 2005). La actividad antioxidante y antimicrobiana que presentan los extractos de las brácteas involucrales de *C. cardunculus* apoyan el uso medicinal tradicional de esta planta y sienta las bases para el empleo de la misma como alimento funcional (Kukic y col., 2008). Las hojas de *C. cardunculus* presentan actividad antioxidante, debido a su composición fenólica, en base a ácidos cafeoil-quinico y glicósidos de luteolina y apigenina (Pinelli y col., 2007; Valentao y col., 2002), o β -sitosterol, sitosteryl-3 β -glucosido, sitosteryl-3 β -acetato, taraxasterol y taraxasteryl-3 β -acetato (Grancai y col., 1992), apigenina, apigenina 7-glucosido, luteolina y luteolina 7-glucosido (Grancai y col., 1993), apigenina 7-rutinosido, luteolina 7-rutinosido (Grancai y col., 1996), y apigenina 7-metilglucoronide (Mucaji y col., 2000), cynarina (Grancai y col., 1994b) y ácido clorogénico (Mucaji y col., 2000), cynarasaponinas A y H y sus metil derivados (Mucaji y col., 1999) y cynarasaponinas B y K (Mucaji y col., 2001), identificados en las brácteas involucrales de esta planta. Los extractos obtenidos de esta parte de la planta también presentan actividad antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *B. subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, y actividad antifúngica sobre *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium ochrochloron*, *Penicillium*

funiculosum, *Trichoderma viride*, *Fusarium tricinctum* y *Alternaria alternata* (Kukic y col., 2008). Las hojas de *Cynara cardunculus* muestran una interesante actividad frente a varias bacterias patógenas para los humanos, posiblemente debido a su específica composición fenólica. Desde el punto de vista de la alimentación, *C. cardunculus* resulta interesante no sólo por su actividad antimicrobiana, sino también como fuente de polifenoles saludables (Falleh y col., 2008).

I.2.9. Problemas asociados a la utilización del cuajo procedente de *Cynara cardunculus* en la actualidad

Hasta hace tan solo tres años no se conocían plantaciones de la especie vegetal *Cynara cardunculus*, de la que se obtiene el cuajo para elaborar la Torta del Casar. Sin embargo, este ingrediente resulta ser fundamental para imprimir al queso sus características diferenciales respecto al resto de quesos, tanto a nivel nacional, como internacional. A pesar de esta importancia, no se ha detectado en el sector quesero la inquietud o necesidad de identificar, caracterizar, conservar o proteger este recurso. De modo que de forma tradicional y actual, las plantas de *Cynara cardunculus* se encuentran repartidas por cunetas, tierras agrícolas marginales o abandonadas, bordes de caminos, de fincas, etc., de forma silvestre.

Este hecho implica por un lado que se desconozca el material genético empleado (a conservar), que ese material se pueda perder por construcciones sobre las tierras abandonadas, carreteras, etc. Por otro lado, este material se perpetúa o reproduce libremente, originando gran variabilidad genética en la población de cardos, *Cynara cardunculus*, de Extremadura, así las flores procedentes de estas plantas presentan características diferentes en su aptitud como cuajo vegetal. Con esta situación, los queseros se conforman con el material que la naturaleza les ofrece, en lugar de poder controlar este recurso y utilizarlo para mejorar sus producciones. Unido a ello, las personas que se dedican a la recolección de las flores de cardo no tienen en cuenta la existencia de dicha variabilidad genética de la población de *Cynara cardunculus*, ni las repercusiones que ello tiene en la elaboración del queso, ya que esto hasta ahora se desconocía. Por lo tanto la trazabilidad de este producto queda en entredicho, por más que el cuajo que se suministra a las queserías hoy en día debe tener Registro Sanitario.

Todo ello se traduce en un cuajo muy heterogéneo, procedente de diferentes plantas, recogidas en distintas localizaciones, lo cual constituye una de las causas de la falta de homogeneidad que se presenta en el queso, tanto desde el punto de vista de rendimiento quesero, hasta diferencias a nivel sensorial (características organolépticas).

En las queserías se recibe como cuajo vegetal un producto a base de pistilos disgregados y secos, siendo imposible reconocer o distinguir si las flores pertenecen a plantas de *Cynara cardunculus* o de otra especie de cardo, con diferentes características coagulantes. De modo que hasta ahora no se podía garantizar la autenticidad del cuajo.

En 2009 la DOP Torta del Casar impulsó el establecimiento de una pequeña plantación de *Cynara cardunculus*, a partir del material genético de la finca La Orden, de la Junta de Extremadura, la cual seleccionó dicho material para producción de biomasa. El paso de plantas silvestres a plantas cultivadas debe hacerse mediante estudios agronómicos, para evaluar la influencia de las técnicas de cultivo en el rendimiento en flores y características tecnológicas de las mismas. Estos estudios deberán abarcar aspectos como la densidad de plantación, el aporte de fertilización, de agua de riego, control de malas hierbas y control de plagas y enfermedades. Se deberá contemplar también el momento ideal de cosecha y estado de maduración de la flor.

El cuajo se prepara de forma tradicional, mediante la maceración en agua de los pistilos de las flores recolectadas en campo. Una vez filtrada esta solución, se añade a la leche para provocar su coagulación. Esta solución presenta una gran carga microbiana procedente de las flores (y de las manos y herramientas de los recolectores), que acaba formando parte de la microflora presente en el queso. (No se somete el cuajo a tecnologías para disminuir la carga microbiana sin causar detrimento en su actividad coagulante y proteolítica). Muchos de estos microorganismos causan alteraciones en el queso, y pueden dar lugar a la aparición de aminos biógenos.

II. OBJETIVOS

1. Caracterizar botánica, genética y fenotípicamente los cardos silvestres recolectados en la región extremeña para la elaboración de la Torta del Casar, así como analizar la aptitud tecnológica que los extractos de los mismos presentan.
2. Evaluar la influencia que los diferentes años y estadios de maduración en la recolección del cardo ejercen sobre las características sensoriales de las tortas.
3. Estudiar las modificaciones en las características físico – químicas, microbiológicas y sensoriales que la utilización de los diferentes cardos recolectados generan en las tortas elaboradas.
4. Ceder a la DOP “Torta del Casar” el cardo más adecuado para la obtención de las mejores tortas.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. Material

III.1.1. Reactivos químicos y medios de cultivo

Todos los reactivos químicos utilizados para el desarrollo de este trabajo fueron de calidad reactiva y pertenecientes a las casas comerciales PANREAC, SIGMA, MERCK, ALDRICH y SCHARLAU.

Los gases empleados en la cromatografía gaseosa procedían de la firma comercial LINDE S.L.

Los medios de cultivo y productos utilizados en las pruebas microbiológicas fueron adquiridos y preparados como recomendaban los distintos fabricantes pertenecientes a las casas comerciales OXOID, MERCK, CULTIMED, PRONADISA, VIOCULT, BIOMEDIX, BOKAR y SCHARLAU.

La leche descremada para la determinación de la actividad coagulante era de la marca LA ASTURIANA. La leche cruda de oveja empleada para la elaboración de los quesos fue suministrada por Quesería Hermanos Pajuelo, inscrita en la DOP Torta del Casar.

Los reactivos utilizados para las extracciones de ADN fueron de las marcas TIB-MOLBIOL, Roche, Pharmacia Biotech, Finnzyme y Sigma.

Los reactivos utilizados para la PCR fueron de las marcas TIB-MOLBIOL, Biotools, Roche, Pharmacia Biotech, Finnzyme y Sigma.

El nitrógeno líquido empleado en la homogenización de las muestras fue cedido por el Centro Nacional de Selección y Reproducción Animal (CENSIRA), y se almacenó en un bidón Air Liquide TR 21.

III.1.2. Aparatos

Las incubaciones se realizaron en una estufa de hibridación HYBAID mod. Shake “n” Stock, mientras que el secado de los precipitados de ADN se realizó en un bloque térmico SELECTA modelo Tembloc.

Para la esterilización mediante filtrado se utilizaron filtros GELMAN SCIENCES de 0,22 µm de diámetro de poro previamente estériles.

Material y Métodos

Los geles de agarosa (Pronadisa) se prepararon en agitadores magnéticos SELECTA con calefacción modelo AGIMATIC-E.

Para preparar los geles de agarosa y como tampón de carrera se utilizó el tampón TAE 1X. Este TAE 1X se elaboró disolviendo 20 ml de TAE 50X (Tris Base 2 M; 5,71% de ácido acético glacial (v/v); EDTA 0,05 M (pH 8)) en 980 ml de agua desionizada.

El tampón de carga se elaboró con 40% (p/v) de sacarosa y 0,25% (p/v) de azul de bromofenol.

Para adicionar el bromuro de etidio se preparó una solución con una concentración de 10 mg/ml, y a partir de esta disolución se añadió una concentración final de 0,5 µg/ml (p/v) (Maniatis y col., 1982).

La electroforesis en gel de agarosa se realizó con cubetas MIDICELL Primo System modelo EC330, MAXICELL Primo System modelo EC340 y BIO_RAD MINISUB modelo CELL GT; y alimentados con una fuente SCIE-PLAS modelo PSU 400/200. Posteriormente, la visualización de ADN extraído se llevó a cabo mediante un transiluminador SYNGENE modelo CHEMI Genius y el programa informático Gene Snap versión 3.06 (SynGene; a Division of Synoptics Ltd., Beacon House, Nuffield Road, Cambridge CB 4 1 TF, England).

El marcador de peso molecular utilizado fue el DNA Molecular Weight Marker IV (0,07-19,3 kpb) de la casa comercial Roche (Roche Diagnostics GMBH, Roche Molecular Biochemicals, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim, Germany). La concentración del marcador fue de 0,25 µg/µl. El marcador contenía 14 fragmentos de ADN con las siguientes pares de bases y concentraciones (Figura 6): 19.329 pb (93,5 ng/µl), 7.743 pb (37,5 ng/µl), 5.526 pb (26,75 ng/µl), 4.254 pb (20,5 ng/µl), 3.140 pb (15,25 ng/µl), 2.690 pb (13 ng/µl), 2.322 pb (11,25 ng/µl), 1.882 pb (9 ng/µl), 1.489 pb (7,25 ng/µl), 1.150 pb (5,5 ng/µl), 925 pb (4,5 ng/µl), 697 pb (3,5 ng/µl), 421 pb (2 ng/µl) y 74 pb. Estos fragmentos eran provenientes de la rotura con las endonucleasas de restricción Sty I y Sau I de cantidades equimolares de λADN y pSPTBM20 ADN. Después de la electroforesis en gel de 1 µg de la mezcla de fragmentos en un gel al 1% de agarosa, son visibles 13 bandas. La banda más pequeña sólo es visible en geles sobrecargados.

Para la cuantificación del ADN se empleó el programa informático Gene Tools versión 3.06 (SynGene; a Division of Synoptics Ltd., Beacon House, Nuffield Road, Cambridge CB 4 1 TF, England).

Para la realización de la PCR se utilizó un termociclador Mastercycler gradient, de la marca EPPENDORF.

Se utilizaron las técnicas SDS y UREA-PAGE para determinar perfiles de proteínas de los cuajos y de los quesos, así como para determinar la actividad proteolítica de los extractos sobre caseínas.

Las incubaciones de las muestras se realizaron en un termobloque SELECTA mod. Termobloc.

Las electroforesis de proteínas se llevaron a cabo en lámina vertical utilizando cubeta BIORAD mod. MINI PROTEN 3 CELL, alimentada por una fuente CG A174.

Las fotografías de los geles de poliacrilamida se realizaron con un analizador de imágenes de la marca SYNGENE mod. GeneGenius.

Para purificar las cardosinas de los extractos se empleó un equipo de ultrafiltración Pellicon XL PXB010A50, Millipore. La solución concentrada se cargó en una columna de flujo rápido Q-Sepharose, acoplada a un sistema FPLC, equipado con un detector UV a 214 nm y un colector de fracciones FRAC-950 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Las fracciones de cardosinas fueron concentradas y filtradas a través de un equipo de ultrafiltración Pellicon-2 PLCGC10, Millipore Corp.

Para la determinación de la actividad coagulante se utilizó un baño termostático.

Para el estudio de la actividad antimicrobiana de los extractos se utilizó un turbidómetro automático BIOSCREEN C.

Para llevar a cabo la elaboración de quesos se utilizó el equipamiento de la planta piloto de la Escuela de Ingenierías Agrarias de Badajoz, (de la Universidad de Extremadura), formado por una cuba de 50 L de capacidad, con camisa de agua, liras y palas, cámaras de refrigeración, prensa neumática, moldes, baños para la salmuera.

Material y Métodos

Las muestras de cardos y de quesos fueron trituradas utilizando una picadora MOULINEX y homogeneizadas mediante un homogeneizador de cuchillas SORVAL OMNIMIXER, mod. 17106.

Para la medición del pH se utilizó un pHmetro de electrodo combinado, de la marca CRISON, modelo Basic20.

Las mediciones de la actividad del agua se realizaron con un medidor LABMASTER._{aw} NOVASINA.

Los medios de cultivo se prepararon en agitadores magnéticos con calefacción de SELECTA, mod. AGIMATIC-E para posteriormente ser esterilizados, al igual que las soluciones y material de laboratorio, en una autoclave de SELECTA mod. PRESOCLAVE 75.

Los microorganismos y reactivos se conservaron en frigoríficos ZANUSSI mod. TROPIC SYSTEM y WHIRPOOL y congelador vertical ZANUSSI, FORMA SCIENTIFIC mod. -80 °C.

En el análisis microbiológico, para el homogeneizado de las muestras se utilizó un Stomacher, Mod. LAB BLENDER 400.

Para la realización de las diluciones y medida de volúmenes se usaron las pipetas automáticas de 1-5 ml, 100-1000 µl, 50-200 µl, 10-100 µl y de 1-10 µl de la marca BIOHIT, y agitadores de tubos HEIDOLPH, Mod. Reax-top.

Las siembras se llevaron a cabo en campanas de flujo laminar TELSTAR mod. AV - 100.

Para las incubaciones se utilizaron estufas SELECTA mod. CONTERM 80L y CONTERM 150L e incubador de CO₂ mod. NUAIRE airjacketed GH Autoflow Automatic mod.2004, Hotcold-M refrigerada y un incubador orbital BRAUN BIOTECH mod. IS.

Los recuentos de colonias se llevaron a cabo en un contador de automático COMECTA mod. DIGITAL S.

Para la determinación del nitrógeno total (Kjeldahl) se utilizó un digestor “BLOC DIGEST 20” P Selecta y un destilador “KJELTEC SYSTEM 1002 DISTILLING UNIT” Tecator.

El perfil de proteínas de los extractos de flores, la producción de aminas biógenas y de iones de los quesos se determinaron mediante electroforesis capilar, utilizando un equipo BECKMAN Pace System serie 5500, dotado con detector diode array que permite la obtención de espectros desde 190 a 600 nm.

Para el análisis por electroforesis capilar se utilizaron columnas suministradas por Beckman, silanizadas, de 75 μm de diámetro interno.

Para la determinación de la grasa se empleó un rotavapor

La extracción de los compuestos volátiles se realizó mediante una fibra de microextracción en fase sólida de Carboxen/Polidimetilsiloxano (PDMS) de SUPELCO con 75 μm de diámetro.

Para la separación de los compuestos volátiles se utilizó el cromatógrafo de gases HEWLETT-PACKARD mod. HP 6890 dotado con una columna capilar de sílice fundido del tipo DB-5 (5% fenil metil silicona) de 30 m x 0,32 mm x 1,05 μm .

La detección de los volátiles se realizó con un detector selectivo de masas HEWLETT-PACKARD HP 5973 y su análisis mediante el programa informático MS-ChemStation. Para la identificación se utilizaron las bases de datos de espectros de masas WILEY y NIST/EPA/NIH del National Institute of Standard and Technology.

Para las mediciones de la textura se utilizó un Texturómetro modelo TA.XTA2i (Stable Micro Systems, Godalming, UK).

El análisis sensorial de los quesos se realizó en un laboratorio equipado con luz fluorescente blanca en puestos individualizados.

Para las pesadas rutinarias se utilizó una balanza METTLER TOLEDO mod. B2002-S con precisión de $\pm 0,01\text{g}$ y para las pesadas de mayor precisión se utilizó una balanza METTLER TOLEDO mod. AB54-S de precisión $\pm 0,0001\text{g}$.

Material y Métodos

Para las centrifugaciones se utilizaron las siguientes centrífugas: centrífuga de sobremesa MICROSPIN SORVALL modelo 24S y una centrífuga de sobremesa refrigerada EPPENDORF 5810 R.

Para las determinaciones de absorbancia se utilizó un espectrofotómetro UNICAM, Mod. Helios α .

La eliminación de los disolventes orgánicos se realizó en un rotavapor (HEIDOLPH Mod. Laborota 4000).

Además se utilizó diverso material de uso general en el laboratorio como destilador de agua (USF ELGA), desionizador de agua mod. ELGASTAT UHQ II, etc.

La homogeneización de las muestras, tanto de cuajos, como de queso, se empleó un Homogeneizador Politron.

Para el filtrado de las muestras se utilizaron filtros GELMAN SCIENCES de 0,2 μm de diámetro de poro y WHATMAN N° 54.

Para las esterilizaciones por filtración se utilizaron filtros MILLIPORE de 0,22 μm de tamaño de poro.

En el tratamiento estadístico de los datos se empleó el programas informático SPSS para Windows, 15.0.

III.1.3. Material biológico

Para el desarrollo de este trabajo se parte de muestras de cardo de las especies *Silybum marianum*, (L.) Goertner, *Onopodom nervosum*, Boiss, *Cynara humilis*, L., *Cynara scolymus*, L., y *Cynara cardunculus*, L. La recogida de las muestras de cardo de las diferentes especies se llevó a cabo en la campaña de 2006, cuando las flores estaban en el estado fenológico de plena floración. Las muestras se recolectaron en localizaciones representativas de la región de Extremadura. A lo largo de las campañas 2007, 2008 y 2009 se recogieron muestras de *Cynara cardunculus*, L. de diferentes zonas de Extremadura, en las que se recolectan los cardos para el suministro a las queserías de la región. Las muestras se recolectaron entre junio y julio, en los estados fenológicos de inicio de floración, plena floración y flor senescente.

Las flores recolectadas se separan del involucre en un laboratorio de la Escuela de Ingenierías Agrarias de la Universidad de Extremadura, dejando los estigmas y estilos que se sequen. Una vez secos, se guardaron las flores de cada muestra por separado en bolsas de plástico y se mantuvieron en un lugar seco, a temperatura ambiente, hasta su utilización.

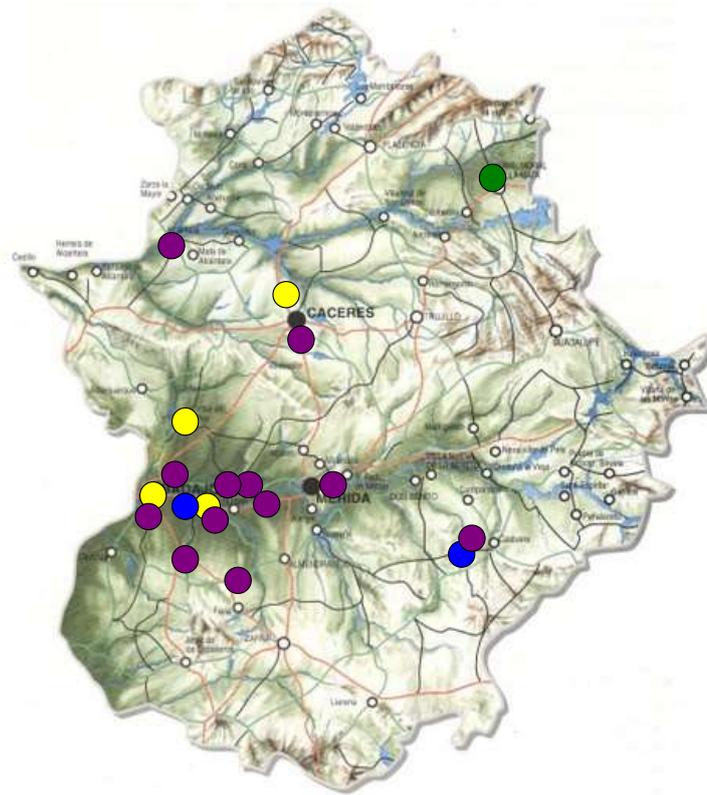


Figura III.5. Localizaciones de recogida de las muestras de cardos de las diferentes especies estudiadas, en Extremadura.

Tabla III. 3. Muestras de cardo de las diferentes especies muestreadas para la realización de este estudio.

Especie	Estado de Maduración¹	Año		Localización²	Nº de muestras
<i>Silybum marianum</i>	b	2006	L7	Talayuela	1
<i>Silybum marianum</i>	b	2006	L1	Balboa-Talavera	1
<i>Silybum marianum</i>	b	2006	L2	Ctra. Mérida-Madrid	1
<i>Cynara humilis</i>	b	2006	L4	Canal Lobón	2
<i>Cynara humilis</i>	b	2006	L8	Ctra. Cáceres	6
<i>Cynara humilis</i>	b	2006	L9	Villar del Rey	2
<i>Onopordum nervosum</i>	b	2006	L10	Badajoz	4
<i>Onopordum nervosum</i>	b	2006	L1	Balboa-Talavera	3
<i>Onopordum nervosum</i>	b	2006	L11	Berlanga	1
<i>Cynara scolymus</i>	b	2006	L12	Cáceres	1
<i>Cynara cardunculus</i>	b	2006	L5	Puebla de la Calzada	1
<i>Cynara cardunculus</i>	b	2006	L13	Villafranco del Guadiana	3
<i>Cynara cardunculus</i>	b	2006	L11	Berlanga	3
<i>Cynara cardunculus</i>	b	2006	L6	Sancha Brava	2

<i>Cynara cardunculus</i>	b	2006	L14	Montijo – La Nava S.	5
<i>Cynara cardunculus</i>	b	2006	L3	La Albuera	3
<i>Cynara cardunculus</i>	b	2006	L15	Santa Marta-Solana	2
<i>Cynara cardunculus</i>	b	2006	L16	Cruce Montijo	1
<i>Cynara cardunculus</i>	b	2006	L2	Ctra. Mérida - Madrid	12
<i>Cynara humilis</i>	b	2006	L10	Badajoz	2
<i>Cynara humilis</i>	b	2006	L17	Casar de Cáceres	4
<i>Onopordum nervosum</i>	b	2006	L1	Balboa-Talavera	2
<i>Cynara scolymus</i>	b	2006	L13	Villafranco del Gadiana	3
<i>Cynara cardunculus</i>	b (2) ² , c (3)	2007	L5	Puebla de la Calzada	5
<i>Cynara cardunculus</i>	a (4), b (2), c (3)	2007	L3	La Albuera	9
<i>Cynara cardunculus</i>	a (5), b (4), c (6)	2007	L6	Sancha Brava	15
<i>Cynara cardunculus</i>	a (4), b (8), c (3)	2007	L14	Montijo – La Nava S.	15
<i>Cynara cardunculus</i>	a (4), b (3), c (7)	2007	L16	Cruce Montijo	14
<i>Cynara cardunculus</i>	b (12), c (5)	2007	L2	Ctra. Mérida - Madrid	17
<i>Cynara cardunculus</i>	b	2008	L12	Cáceres	2
<i>Cynara cardunculus</i>	b (2), c (4)	2008	L18	La Orden-Guadajira	6

<i>Cynara cardunculus</i>	b (3), c (8)	2008	L1	Balboa-Talavera	11
<i>Cynara cardunculus</i>	b (6), c (3)	2008	L14	Montijo – La Nava S.	9
<i>Cynara cardunculus</i>	b (8), c (7)	2008	L2	Ctra. Mérida-Madrid	15
<i>Cynara cardunculus</i>	b (3), c (3)	2008	L3	La Albuera	6
<i>Cynara cardunculus</i>	b (4), c (4)	2008	L6	Sancha Brava	8
<i>Cynara cardunculus</i>	b (4), c (4)	2009	L19	Alcántara	8

¹ a: la flor se está abriendo, solo algunos estigmas y estilos son visibles; b: flor completamente abierta, incluso con polen; c: flor comienza a secarse, algunos estilos y estigmas son de color marrón.

² Coordenadas geográficas: L1: 38° 54' 8,82" N 6° 43' 59,9" W, L2: 38° 50' 34,8" N 6° 57' 39,73" W, L3: 38° 45' 6,73" N 6° 48' 10,42" W, L4: 38° 52' 29,07" N 6° 45' 11,50" W, L5: 38° 53' 59,94" N 6° 51' 12,43" W, L6: 38° 56' 32,78" N 6° 20' 23,16" W, L7: 39° 59' 7,44" N 5° 35' 21,59" W, L8: 39° 19' 30,53" N 6° 29' 54,41" W, L9: 39° 8' 5,03" N 6° 51' 13,63" W, L10: 38° 54' 23,07" N 6° 58' 15,10" W, L11: 38° 17' 23,93" N 5° 49' 48,00" W, L12: 39° 26' 19,40" N 6° 22' 52,95" W, L13: 38° 53' 55,65" N 6° 53' 15,99" W, L14: 38° 55' 20,77" N 6° 35' 57,79" W, L15: 38° 37' 55,93" N 6° 37' 0,20" W, L16: 38° 55' 16,44" N 6° 57' 23,19" W, L17: 39° 35' 31,47" N 6° 23' 30,03" W, L18: 38° 51' 17,61" N 6° 41' 20,37" W, L19: 39° 42' 25,67" N 6° 53' 5,49" W.



Figura III.6. Plantas de las especies A. *Silybum marianum* (L) Goertner, y B. *Onopordum nervosum*, L.

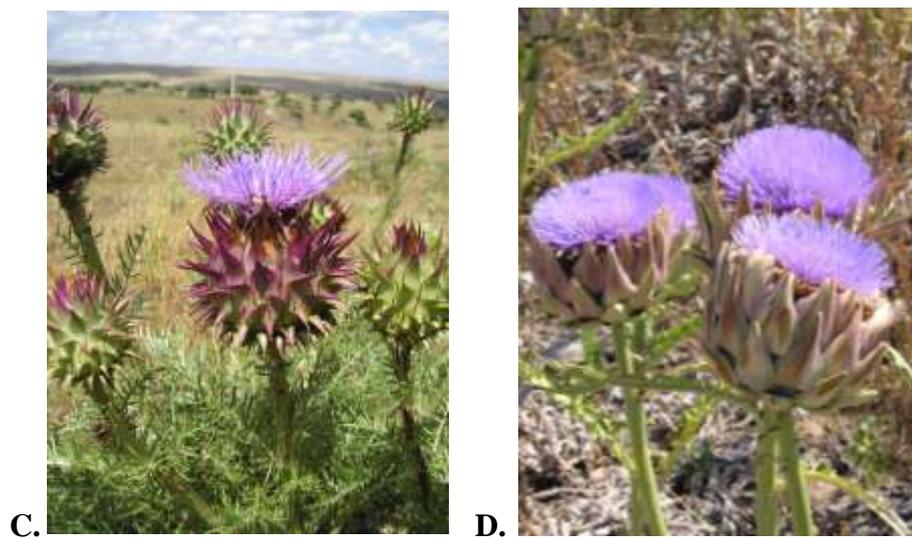


Figura III.7. Plantas de las especies C. *Cynara humilis*, L. y D. *Cynara scolymus*, L.



E.

Figura III.8. Planta de la especie E. *Cynara cardunculus*, L.

III.2. Métodos

III.2.1. Toma de muestras de cardos de diferentes especies (2006). Toma de muestras de *Cynara cardunculus* (2007-09).

Se recolectaron muestras de hojas y flores de varias especies de cardo en varias localizaciones de Extremadura, y una vez secas, se almacenaron en lugar seco y a temperatura ambiente. Las hojas y las flores se recolectaron individualmente planta por planta con el fin de analizar la variación intra – especie. El muestreo de las flores se realizó teniendo en cuenta el estado fenológico de la flor. En la campaña de 2006 se recogieron un total de 65 muestras en el estado de plena floración, de las especies *Silybum marianum*, *Onopordom nervosum*, *Cynara humilis*, *Cynara scolymus* y *Cynara cardunculus*.

A lo largo de las campañas de 2007, 2008 y 2009, se recogieron un total de 140 muestras de la especie *Cynara cardunculus*, de las zonas más representativas de la región de Extremadura. Estas muestras se recogieron en 3 estados de maduración de la flor, inicio de floración, plena floración y senescencia de la flor. Se llevaron a un laboratorio de la Escuela de Ingenierías Agrarias para ser analizadas. Se separaron los estigmas y estilos del involucre de la flor y se dejaron secar a temperatura ambiente. Una vez secas las flores se guardaron en bolsas de plástico, en un lugar seco y a temperatura ambiente hasta que fueron utilizadas.

III.2.2. Caracterización morfológica

La caracterización morfológica se llevó a cabo *in situ*, en el campo, donde las plantas de cardo de las diferentes especies eran muestreadas, teniendo en cuenta la guía de Clasificación de Valdés y col. (1987), para la descripción de las características morfológicas principales de estas especies.

Las especies de cardo muestreadas pertenecen a la familia de las Asteraceae. Crecen como hierbas o arbustos. Sus inflorescencias aparecen en capítulos, rodeados por un involucre de brácteas coriáceas. El fruto es un aquenio con un vilano para la dispersión de las semillas.

III.2.3. Extracción de ADN

El método de extracción empleado está basado en los trabajos realizados por Lodhi y col. (1994) y Porebski y col. (1997), el cuál fue mejorado por Hernández (2007). La principal característica de este método es la utilización de un tampón de extracción cuya composición es Tris base 100 mM; NaCl 1,4 M; EDTA 20 mM (pH 8); 2% de cetiltrimetilamonio de bromo (CTBA) y 0,3% de 2-mercaptoetanol. El 2-mercaptoetanol se añadió a la muestra por separado del tampón de extracción, justo después de la adicción de este.

El proceso se inició con la homogenización de la muestra, hojas de cardo, para lo cual se tomó una cantidad variable de hoja de cardo, que se fraccionó con un bisturí y seguidamente se pulverizó en un almirez metálico (previamente esterilizado) con la ayuda de nitrógeno líquido. Una vez homogenizadas las muestras se pesaron aproximadamente 0,5 g de hoja de cardo en un tubo cónico estéril de 50 ml de volumen máximo y se conservaron en hielo picado. Todo el proceso se realizó en condiciones de esterilidad con mechero, y utilizando los bisturí, pinzas y espátulas esterilizados con etanol (70% v/v).

A la muestra pesada se le añadió 10 ml del tampón de extracción. Seguidamente se añadió 30 µl de 2-mercaptoetanol, 400 µl de proteinasa K (Sigma) esterilizada mediante filtración, con una concentración de 10 mg/ml; y 200 µl de ARNasa (Sigma) esterilizada mediante filtración, con una concentración de 10 mg/ml; incubando la disolución a 60 °C durante 1 hora y 30 minutos en movimiento continuo. Transcurrido el tiempo de incubación, se continuó la extracción del ADN con la adición de 3 ml de 5

M acetato potásico y tras dejar reposar la dilución 2 minutos, se recogió el sobrenadante mediante alícuotas de 600 µl en microtubos de 1,5 ml de volumen. La purificación de este extracto se llevó a cabo mediante un lavado con 600 µl de fenol-cloroformo alcohol isoamílico (25:24:1) (Sigma) y centrifugado a 10.000 x g durante 10 minutos. La fase superior se recogió en alícuotas de 400 µl en microtubos de 1,5 ml de volumen, y se precipitó el ADN con 150 µl de isopropanol y etanol (100% v/v) a -20 °C. Para favorecer la precipitación los microtubos se mantuvieron a -20 °C durante 12 horas. Seguidamente se centrífugo a 7000 x g durante 3 minutos, eliminando el sobrenadante y lavando el precipitado con 500 µl de etanol (70% v/v) a -20 °C. La nueva centrifugación a 7000 x g/2 min., el eliminado del sobrenadante y el secado del precipitado a 37 °C en el bloque térmico aseguraron la eliminación del etanol. Una vez seco, el ADN se resuspendió a 4 °C en 100 µl de agua desionizada estéril hasta la solubilización completa.

III.2.4. Análisis de AND mediante técnicas RAPD-PCR

Electroforesis en geles de agarosa

Después de realizar las extracciones de ADN se procedió a una evaluación y cuantificación del mismo mediante electroforesis horizontal submarina en gel de agarosa con bromuro de etidio.

Las muestras fueron preparadas añadiendo aproximadamente 1 µl de tampón de carga (Sambrook y col., 1989) por cada 5 µl de disolución de ADN. Los geles se prepararon hirviendo un 1% de agarosa en tampón TAE 1X. Las electroforesis se realizaron con voltaje constante inferior a 100 voltios. Para la determinación del peso molecular se cargó en un pocillo 2 µl de marcador DNA Molecular Weight Marker IV disuelto en 1 µl de tampón de carga.

Las muestras se consideraron adecuadas cuando no hubo presencia de ARN, y el ADN se mostró como una banda de tamaño definido y homogéneo para todas ellas.

La cuantificación de la concentración del ADN extraído se realizó mediante comparación con el DNA Molecular Weight Marker IV y el programa Gene Tools.

Digestión mediante enzimas de restricción

Para la determinación de la pureza del ADN mediante corte con enzimas de restricción se utilizó el método descrito por Michiels y col. (2003) y Puchooa (2004). Se tomaron 20 µl de ADN y se le añadieron 3 µl de tampón de reacción 10X, se añadieron 2 µl de la enzima Eco RI y se completó la reacción a 25 µl de volumen final con agua desionizada estéril. La reacción se incubó a 37 °C durante 12 horas.

Finalizada la incubación se procedió a la visualización del corte con endonucleasas mediante electroforesis horizontal submarina en gel de agarosa con bromuro de etidio como se detalla en el método anterior. El marcador de peso molecular utilizado fue el DNA Molecular Weight Marker IV.

Las muestras se consideraron adecuadas cuando se observa una banda degradada de ADN debido a la digestión enzimática.

Purificación del ADN extraído

Debido a la extracción, junto al ADN de los cardos, de moléculas que impedían el correcto funcionamiento de la DNA polimerasa durante la PCR, se procedió a purificar el ADN extraído de cada muestra. Esta purificación se llevó a cabo utilizando el kit de purificación de ADN “High Pure PCR Product Purification Kit” de Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. Éste retiene el ADN al ser centrifugado a través de unas columnas. Finalmente el producto purificado se eluyó en 100 µl de tampón de elución.

Técnicas basadas en la PCR

Todas las técnicas basadas en la PCR que se utilizaron en este trabajo se optimizaron en cuanto a las concentraciones de reactivos y condiciones de amplificación de los productos de la PCR. Las modificaciones realizadas y los valores que se consideraron más óptimos se muestran en los respectivos apartados. Se realizaron cambiando en cada grupo de experimentos una sola variable. De esta forma, se utilizó el valor óptimo obtenido de cada variable para experimentos posteriores. La concentración de DNA polimerasa, de cebador y de dNTPs no fue modificada. Las

concentraciones testadas estaban basadas en estudios previos donde se optimizaron técnicas de PCR (Parejo, 1996; Díaz-Amigo, 1999; Arroyo, 2001; de la Rosa, 2002; Hernández, 2007).

Después de realizar las PCR con las condiciones optimizadas para cada cebador, se procedió a una evaluación y cuantificación de los productos obtenidos mediante electroforesis horizontal submarina en gel de agarosa con bromuro de etidio. De manera similar a como se realizó tras la extracción de ADN, las muestras fueron preparadas añadiendo 4 μl de tampón de carga y 20 μl de disolución de ADN. Los geles se prepararon hirviendo un 2% de agarosa en tampón TAE 1X. En este caso, las electroforesis se realizaron con voltaje constante inferior a 75 voltios. Para la determinación del peso molecular se cargó en un pocillo 2 μl de marcador DNA Molecular Weight Marker VI (2,1 kpb-0,15 kpb) disuelto en 2 μl de tampón de carga.

Este marcador este compuesto de 15 fragmentos con los siguientes pesos moleculares y concentraciones: 2.176 pb (55,5 ng/ μl), 1.766 pb (44,75 ng/ μl), 1.230 pb (31,25 ng/ μl), 1.033 pb (26,25 ng/ μl), 653 pb (16,75 ng/ μl), 517 pb (13,25 ng/ μl), 453 pb (11,5 ng/ μl), 394 pb (10 ng/ μl), 298 pb (7,625 ng/ μl), 298 pb (7,265 ng/ μl), 234 pb (6 ng/ μl), 234 pb (6 ng/ μl), 220 pb (5,5 ng/ μl), 154 pb (3,875 ng/ μl) y 154 pb (3,875 ng/ μl); provenientes de la mezcla del corte con Bgl I de pBR328 ADN con el corte de Hinf I de pBR328 ADN.

RAPD-PCR (Cebadores aleatorios)

La reacción se desarrolló en 30 μl de volumen a partir de las concentraciones de los siguientes reactivos:

- 3 μl de tampón de reacción de la Taq DNA polimerasa 10X (Tris-HCl 75 mM (pH 9); KCl 50 mM; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20 mM).
- 0,7 μl de mezcla de nucleótidos, con una concentración de 10 mM cada nucleótido.
- 2,5 μl de MgCl_2 a una concentración de 50 mM.
- 1 μl de la solución acuosa del cebador, a una concentración de 50 μM .
- 3 μl de solución de ADN (50 ng/ μl).

- 18,8 µl de agua desionizada y esterilizada.

Una vez realizada la disolución con los anteriores componentes, se realizó una primera desnaturalización a 94 °C durante 3 minutos, posteriormente se añadió 1 µl de una solución de DNA polimerasa (1U/µl) (Biotools) y se adicionó 20 µl de aceite mineral estéril para evitar la evaporación.

Las condiciones de amplificación empleadas fueron las descritas en la Tabla III.2:

Tabla III.4. Condiciones de amplificación empleadas en los RAPD-PCR.

Etapas	Temperatura (° C)	Tiempo (min)	Nº ciclos
Desnaturalización	94	0,5	35
Hibridación	45	1	
Extensión	72	1	
Extensión final	72	5	

Para determinar el perfil genético de las variedades de cardo se utilizaron 7 cebadores aleatorios para el desarrollo de la técnica RAPD (Tabla III.3). Estos cebadores fueron seleccionados fundamentalmente de otros estudios basados en la caracterización genética de vegetales.

Tabla III.5. Cebadores utilizados para el desarrollo de la técnica RAPD.

CEBADORES	SECUENCIA (5-3)	REFERENCIA
OPAE10	CTGAAGCGCA	Hernández (2007)
OPB06	TGCTCTGCCC	Hernández (2007)
OPB07	ACGCGCCCT	Hernández (2007)
OPE19	ACGGCGTATG	Hernández (2007)
OPF05	CCGAATTCCC	Hernández (2007)
OPF08	GGGATATCGG	Hernández (2007)
OPG12	CTCCCAGGGT	Hernández (2007)

Para optimizar la amplificación, se llevaron a cabo variaciones en la composición de la mezcla de reacción empleando el cebador OPE19. Las variaciones realizadas se llevaron a cabo modificando en cada experimento uno sólo de los componentes de la reacción (Tabla III.4) hasta obtener los mejores resultados de amplificación.

Tabla III.6. Concentraciones evaluadas de reactivos para la optimización de la técnica RAPD.

Variable	Unidades	Valores Testados
Tampón 10X	µl	2,5 3
Cl₂Mg	µl	1,5 2 2,5 3
ADN	µl	1 2 2,5 3 5 10
Cebador	µl	1
dNTPs	µl	0,7
Polimerasa	µl	1

También se evaluó la incidencia de las condiciones de amplificación sobre la obtención de los productos resultantes. Las condiciones de amplificación empleadas inicialmente fueron las utilizadas por Hernández (2007) para la caracterización de distintos pimentones. A partir de estas condiciones se hicieron las modificaciones que se muestran en la Tabla III.5:

Tabla III.7. Condiciones de amplificación testadas para la optimización de la técnica RAPD.

FASES	T ^a (° C)	Tiempo (min)
Desnaturalización inicial	94	3
Desnaturalización	94	30
Hibridación	40	1
	45	1
Extensión	72	1
Extensión final	72	5
CICLOS (N° ciclos)		35

III.2.5. Análisis de ADN mediante microsatélites (SSRs)

Para el desarrollo de la PCR con los cebadores no aleatorios, la reacción se llevó a cabo en un volumen de 30 µl, donde se utilizaron las siguientes concentraciones de reactivos:

- 3 µl de tampón de reacción de la Taq DNA polimerasa 10X (Tris-HCl 75 mM (pH 9); KCl 50 mM; (NH₄)₂SO₄ 20 mM).
- 0,7 µl de mezcla de nucleótidos, con una concentración de 10 mM cada nucleótido.
- 2,5 µl de MgCl₂ a una concentración de 50 mM.
- 2 µl de la solución acuosa del cebador, a una concentración de 50 µM, perteneciendo 1 µl a la parte directa del cebador y el otro µl al reverso.

Material y Métodos

- 1 μl de solución de ADN (50 ng/ μl).
- 19,8 μl de agua desionizada y esterilizada.

Una vez realizada la disolución con los anteriores componentes, al igual que con el RAPD-PCR, se realizó una primera desnaturalización a 94 °C durante 3 minutos y posteriormente se añadió 1 μl de una solución de DNA polimerasa y se adicionó 20 μl de aceite mineral estéril para evitar la evaporación.

Las condiciones de amplificación empleadas fueron las mismas que las descritas en la tabla 2 para el desarrollo del RAPD-PCR.

En este caso se utilizaron 10 cebadores para determinar el perfil genético de las variedades de cardo estudiadas (Tabla III.6):

Tabla III.8. Cebadores utilizados para la amplificación de los SSRs

CEBADORES	SECUENCIA (5'-3')		REFERENCIA
CMAFLP-01	TCATGGCATTATGAATGTT	DIRECTO	
	ATAAATATTTTGATTGTTTTCT	REVERSO	
CMAFLP-04	CGATAGCTCTTTCCCTTT	DIRECTO	
	ATGGGTGAGATTGGTTTAC	REVERSO	
CMAFLP-07	GGCTCCACCGTACTCCTA	DIRECTO	
	TCTCTCGTCAGTAAACCC	REVERSO	
CMAFLP-08	AGGTGTGAAGGCTTCATC	DIRECTO	
	TCCCGAGATCCTTGACTCAG	REVERSO	
CMAFLP-11	GAAGGAGAAGCTTGATATCTG	DIRECTO	Acquadro y col. (2005)
	CATCCTCACGAGGACATC	REVERSO	
CMAFLP-13	TTTGATCTTGTCCTATATATATA	DIRECTO	
	TCGGCTTTTCTGAATATC	REVERSO	
CMAFLP-15	TTGAGAGGGTTTTCCGAGAG	DIRECTO	
	TAGGATGAGTCCTGAGTAAT	REVERSO	
CMAFLP-18	AAGTGTTGCATAATAACTTACC	DIRECTO	
	CCGAACAAATTGCTTACAA	REVERSO	
CMAFLP-21	TAAATAGTTAGTGTTCTCGTTTG	DIRECTO	Acquadro y col. (2005)
	TGGGGTTGTATTGGTTG	REVERSO	
CMAFLP-24	GCCCGTTCACACACAACA	DIRECTO	Acquadro y col. (2005)
	CAGGTTCTTTTATACAGCAG	REVERSO	
CMAFLP-110	AGTGGGTAAGTGGGGATG	DIRECTO	Acquadro y col. (2005)
	ATCTCCACATTTTCTCCTCC	REVERSO	

Las concentraciones de reactivos ensayadas para la optimización de este procedimiento se muestran en la Tabla III.7:

Tabla III.9. Concentraciones de reactivos empleadas para la amplificación de los SSRs.

Variable	Unidades	Valores Testados		
Tampón 10X	μl	3		
Cl₂Mg	μl	2	2,5	3
ADN	μl	0,5	1	2 5
Cebador	μl	2		
dNTPs	μl	0,7		
Polimerasa	μl	1		

Las condiciones de amplificación ensayadas fueron las que se detallan en la Tabla III.8:

Tabla III.10. Condiciones de amplificación empleadas para la optimización de los SSRs.

FASES	T ^a (° C)	Tiempo (min)
Desnaturalización inicial	94	3
Desnaturalización	94	30
Hibridación	45	1
	50	1
	55	1
Extensión	72	1
Extensión final	72	5
CICLOS (N° ciclos)		35

III.2.6. Extracción de proteínas del cuajo vegetal para análisis mediante SDS-PAGE.

Para el análisis de proteínas mediante la técnica SDS-PAGE se prepararon extractos acuosos de las diferentes especies de cardo de la familia de las Asteráceas, a partir de 1 g de flor seca y picada, que se maceraba en 5 ml de agua durante 4 horas a temperatura ambiente. La solución obtenida se filtró a través de papel de filtro Whatman N° 4.

III.2.7. Perfil de proteínas del cuajo mediante SDS-PAGE

Las proteínas extraídas como se ha descrito anteriormente para su análisis mediante SDS-PAGE se mezclaron con 30 µl de buffer PAGE de carga (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 20 % (p/v) glicerol, 2 % (p/v) SDS, 5 % (p/v) β-mercaptoetanol, 0,025 % (p/v) bromofenol azul) y fueron incubadas a 99° C durante 5 min para la desnaturalización de las proteínas. Las condiciones de electroforesis son las descritas

Material y Métodos

por Laemmli (1970), y las concentraciones para la acrilamida (29:1 acrilamida/bisacrilamida) en los geles fue de 4 % (p/v) para el gel concentrador, y de 15 % (p/v) para el gel separador. Los geles fueron montados y pinchados en un dispositivo Miniprotean III (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA).

Para determinar el peso molecular de las distintas fracciones se utilizó un patrón de proteínas constituido por miosina (205 kDa), β -Galactosidasa (116kDa), Fosforilasa B (97 kDa), albúmina (66 kDa), Glutámico deshidrogenasa (55 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (36 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), tripsinógeno (24 kDa), inhibidor de la tripsina (20 kDa), α -lactoalbúmina (14,2 kDa) y aprotinina (6,5 kDa), suministrado por la casa comercial de SIGMA.

El tampón utilizado para la carrera fue Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS al 0,1%, pH 8,3. Las electroforesis se realizaron a 100 w los primeros 20 min y a 150 w hasta el final de la carrera. Una vez finalizado el desarrollo electroforético, los geles fueron tratados con una solución de tinción constituida por 0,25 g de azul de Comassie R-250 en una solución 1:1 metanol-agua al 90 % y ácido acético al 10 % durante 15 minutos, transcurrido los cuales fueron desteñidos en una solución de metanol al 30 % y ácido acético al 10 %.

Se utilizó un programa informático de análisis de imágenes (Genetools, Synoptics Ltd., Cambridge, U.K.) para el análisis densitométrico del gel de electroforesis.

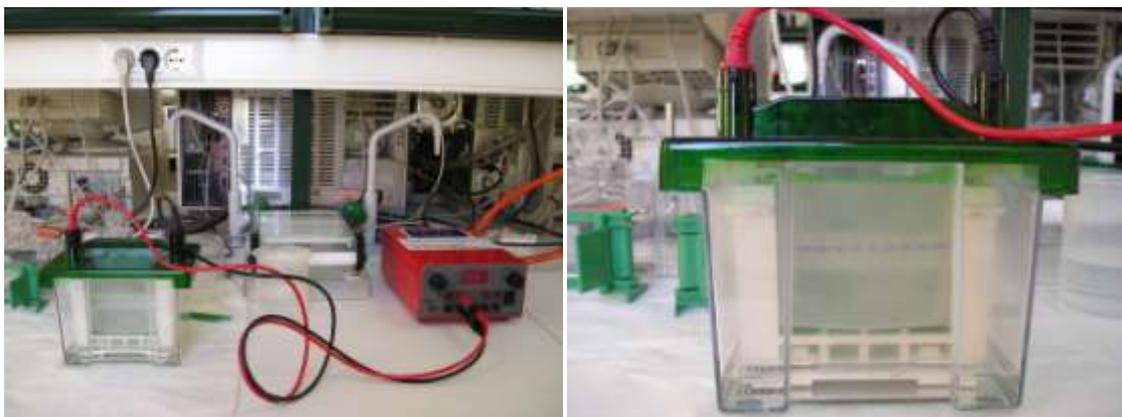


Figura III.9. Cubetas de electroforesis capilar (SDS-PAGE)

III.2.8. Extracción de proteínas del cuajo vegetal para análisis mediante FZCE.

Para conseguir un mejor resultado en la extracción de proteínas, se incluyó un paso previo, que consistía en mezclar 1 g de flor de cardo con metanol (3:10 p/v) durante 5 min a temperatura ambiente, según el método descrito por Hernández y col. (2006). Mayor tiempo de extracción no mejoró la efectividad de la extracción. La suspensión homogeneizada periódicamente, se centrifugó a 5800 g durante 5 min y se recogió el sobrenadante. A partir de una alícuota de 0,5 ml, las proteínas solubles en metanol fueron parcialmente precipitadas (excepto la mayor parte de la fracción proteica apolar) con cloroformo (1:2 v/v) y centrifugadas a 24000 g durante 5 min. Los pellets se lavaron dos veces con cloroformo y después se disolvieron en 100 µl de acetonitrilo (30 % v/v) según el protocolo descrito por Hernández y col. (2007).

III.2.9. Perfil de proteínas del cuajo mediante FZCE

Los extractos de proteínas fueron en primer lugar filtrados a través de un filtro de 0,2 µm y fueron analizados mediante FZCE. Las separaciones se realizaron en un aparato PACE 5500 (Beckman Instruments, INC., Palo Alto, CA). Para minimizar la interacción de las proteínas con la pared de la columna, se eligieron valores de pH básicos para la carrera. El buffer electrolito fue preparado con agua de calidad HPLC obtenida mediante el sistema de purificación de agua Mili-Q, y estaba formado por fosfato monosódico 8,75 mM, tetraborato sódico 20,6 mM a un pH nominal de 9. Se empleó un capilar (soldado/fundido) de 75 µm de diámetro interno y 57 cm de longitud total (50 cm de abertura al detector) (Supelco, Tecknocroma, Barcelona, España). Los capilares fueron inicialmente acondicionados con 100 mM NaOH durante 10 min y después con agua desionizada durante 5 min. Fueron aclarados entre separaciones durante 2 min con 100 mM NaOH, con agua desionizada durante 2 min y con buffer de separación durante 2 min. Al finalizar la carrera los capilares se aclararon con 100 mM NaOH durante 10 min, seguido de agua durante 10 min, y finalmente se secaron con nitrógeno durante 10 min. El voltaje de separación fue 263 V/cm (15kV) y la temperatura de separación, 23° C. La longitud de onda empleada para el seguimiento del ensayo fue de 254 nm. Las muestras fueron inyectadas bajo una presión (0,5 psi) durante 5 s y el espectro de proteínas fue monitorizado de 190 a 300 nm con detector

diode array PACE (Beckman Instrument Inc., Palo Alto, CA, USA). Para la determinación de los parámetros analíticos, se visualizó un pico negativo de acetonitrilo, a 254 nm, empleado para normalizar las áreas de los picos y calcular los correctos tiempos de migración (CMT) de los picos. Los picos de las proteínas se identificaron mediante el correcto tiempo de migración y el espectro de absorbancia UV. El programa Beckman P/ACE Station (Versión 1.21) fue empleado para almacenar, procesar y comparar los electroferogramas.

Con el fin de mejorar la resolución de los perfiles de proteínas obtenidos mediante esta técnica se llevaron a cabo unos ensayos, que consisten en utilizar buffer con diferentes concentraciones de acetonitrilo, 0, 10, 20 y 30 %.

El mejor resultado se obtuvo con el buffer que incorpora acetonitrilo al 20 %. Por esta razón, los perfiles de las muestras recogidas entre los años 2007 y 2009 se obtuvieron con la misma técnica descrita, pero con buffer con acetonitrilo.

III.2.10. Purificación de cardosinas

Se purificaron patrones de cardosinas a partir de las flores de *C. cardunculus* según Sidrach y col. (2005) con algunas modificaciones. Los estigmas y estilos de las flores de cardo (100 g) fueron molidos en una picadora de alimentos y homogeneizados en 800 ml de buffer citrato 50 mM (pH 3.0), con NaCl 1 M para prevenir la obturación de las membranas del filtro por parte de proteinasas no específicas en la siguiente etapa de ultrafiltración. Esta solución homogeneizada fue filtrada a través de una gasa para eliminar los residuos sólidos. Se centrifugó a 24000 rpm durante 20 min, el sobrenadante se filtró a través de un papel de filtro Whatman 4. La solución resultante, formada por el extracto crudo de cardo, fue concentrada y dializada mediante ultrafiltración (Pellicon XL PXB010A50, Millipore) contra buffer Tris-HCl 25 mM, pH 7,6, acoplado a un sistema FPLC equipado con un detector UV a 214 nm y un colector FRAC-950 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Tras la aplicación de la muestra, las enzimas fueron desplazadas con gradientes de NaCl 0,3, 0,35 y 0,5 M en el buffer anterior. Se recogieron las fracciones que contenían las cardosinas. Antes del análisis mediante FZCE, las fracciones de cardosinas fueron concentradas y dializadas mediante ultrafiltración (Pellicon-2 PLCGC10, Millipore Corp.) contra agua ultrapura.

III.2.11. Determinación de la actividad proteolítica del cuajo

Los extractos de las flores secas se prepararon macerando 0,25 g de flores secas en 5 ml de agua (que corresponde a la proporción 50 g/L agua), a temperatura ambiente, durante 4 horas. El homogenado se filtró a través de papel de filtro Whaman n° 4. El sustrato empleado para la degradación por parte de los extractos consistió en una mezcla de caseínas bovinas (Sigma Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA (α , β and κ) a una concentración de 0,5 mg/ml de cada caseína, disueltas en 5 ml de agua destilada. Los extractos de flores secas se maceraron con la mezcla de caseínas, a 2,5 % de extracto (v/v) durante 2 horas, a temperatura ambiente, para permitir la degradación de las caseínas. Después de este tiempo, los extractos junto con las caseínas degradadas fueron desnaturalizados mediante adición de 30 μ l de buffer de carga PAGE (Tris-HCl 6,25 mM, pH 6,8, glicerol 20 % (p/v), SDS 2 % (p/v), β -mercaptoetanol 5 % (p/v), azul bromofenol 0,025 % (p/v)) e incubación a 99° C durante 5 min. Las condiciones de electroforesis y el método de análisis empleados se describieron en el apartado III.2.7.

III.2.12. Determinación de la actividad coagulante del cuajo

La actividad coagulante se determinó según el método estándar (NILACTM; NIZO, Ede, The Netherlands) usando leche descremada en polvo bovina. El sustrato fue preparado disolviendo 12 g de leche en polvo en 100 ml de CaCl₂ 0,01 M (pH 6,5) a 30° C. La leche fue empleada como un sustrato estándar y homogéneo, aunque los extractos de cardo testados se usan sobre leche cruda entera de oveja en la elaboración de los quesos. El ensayo enzimático fue realizado empleando 0,2 ml de extracto acuoso de cardo añadiendo 2 ml de leche reconstituida y el tiempo de actividad coagulante fue determinado visualmente. Una unidad de cuajado (R.U.) se define como la cantidad de extracto acuoso de cuajo que se necesita para cuajar 10 ml de leche descremada reconstituida a 30° C en 100 s (FIL-IDF 157/1992). Las determinaciones se realizaron por cuadruplicado y la media de cada cuatro datos se consideró como dato.

III.2.13. Determinación de la actividad antimicrobiana del cuajo

Dado que las hojas de *Cynara cardunculus* muestran una interesante actividad contra varias bacterias patógenas para los humanos, probamos si el extracto obtenido de las flores de cardo, empleado como cuajo, muestra el mismo efecto inhibitorio sobre siete cepas de bacterias patógenas y sobre seis cepas de bacterias lácticas: *Listeria monocytogenes* CECT 934, *Listeria monocytogenes* CECT 911, *Salmonella enteritidis* (1263) (cedida por Centro Tecnológico Nacional Agroalimentario Extremadura, CTAEX), *Escherichia coli* CECT 4267, *Staphylococcus aureus* CECT 976, *Bacillus cereus* CECT 131, *Yersinia enterocolitica* CECT 559, *Lactobacillus plantarum* CECT 223, *Lactobacillus brevis* CECT 216, *Lactobacillus sakei* ssp. *carneus* CECT 5766, *Lactobacillus curvatus* CECT 904, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* CECT 394, *Pediococcus pentosaceus* CECT 923.

Las cepas fueron cultivadas en caldo (BHI para las bacterias no lácticas y MRS para las bacterias lácticas) durante 48 h a 30° o 37° C según la cepa. Las cepas utilizadas para este ensayo y las condiciones de cultivo de las mismas se muestran en la Tabla III.9:

Tabla III.11. Cepas usadas como indicadores en el estudio de la actividad antimicrobiana y sus respectivos medios para su crecimiento.

Cepa	Caldo de recuperación	Agar específico
<i>Listeria monocytogenes</i> CECT 934	Caldo palcam	Agar BHI
<i>Listeria monocytogenes</i> CECT 911	Caldo palcam	Agar BHI
<i>Salmonella enteritidis</i> 1263(CTAEX)	Caldo BHI	Agar BHI
<i>Staphylococcus aureus</i> CECT 976	Caldo BHI	Agar BHI
<i>Bacillus cereus</i> CECT 131	Caldo BHI	Agar BHI
<i>Escherichia coli</i> CECT 4267	Caldo BGBL	Agar BHI
<i>Yersinia enterocolítica</i> CECT 559	Caldo BHI	Agar BHI
<i>Lactobacillus plantarum</i> CECT 223	Caldo MRS	Agar MRS
<i>Lactobacillus brevis</i> CECT 216	Caldo MRS	Agar MRS
<i>Lactobacillus sakei ssp. carnosus</i> CECT 5766	Caldo MRS	Agar MRS
<i>Lactobacillus curvatus</i> CECT 904	Caldo MRS	Agar MRS
<i>Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides</i> CECT 394	Caldo MRS	Agar MRS
<i>Pediococcus pentosaceus</i> CECT 923	Caldo MRS	Agar MRS

Los extractos de flores de *C. cardunculus* fueron preparados tal y como se preparan en las queserías, macerando 50 g de flores secas en 1 L de agua durante 24 h a temperatura ambiente, ajustando el pH a 6,5, usando NaOH como neutralizador. Después se filtraron a través de un filtro esterilizador (0,22 µm). Se evaluó la capacidad de los extractos de flores de *C. cardunculus* para evitar el crecimiento de las bacterias patógenas y de bacterias lácticas mediante el seguimiento del crecimiento microbiano a 37° C durante 1 día en un turbidímetro automático Bioscreen C (Labsystems, Finland). La densidad óptica fue medida con un filtro de banda ancha (OD 420-580 nm). Inóculos de 5 % en un volumen total de 210 µl. Los medios de cultivo control empleados fueron caldo MRS y BHI, sin suplementos y con un pH ajustado a 6,5. La actividad antimicrobiana de los extractos de las flores de cardo se determinó comparando los ratios de crecimiento de los microorganismos (Tabla III.9) frente al crecimiento en los medios de cultivo control. Las densidades ópticas por debajo de 200, 400 y 600

unidades de absorbancia arbitraria (UAA) respecto al control se consideraron como actividad antimicrobiana baja, media y alta respectivamente.

III.2.14. Elaboración de quesos tipo “Torta del Casar”

Se elaboraron un total de 16 lotes de queso tipo “Torta del Casar”, de 10 quesos en cada lote. Se utilizó leche cruda de oveja de la raza Merina, y no se emplearon cultivos starter. Cada uno de los lotes se elaboró con cuajo procedente de las 16 muestras de cardo *Cynara cardunculus* seleccionadas (Tabla III.10). Los extractos acuosos de las flores de *C. cardunculus*, cuajos, se prepararon a partir de 50 g de flores secas y picadas que se maceraron en 1 L de agua, durante 24 h. Se añadieron 10 ml de cuajo/L de leche, a la leche previamente calentada hasta 28-30° C, para cada lote de 32 L de leche. Una vez que se forma la cuajada se corta con las liras de la cuba hasta conseguir el tamaño de grano de arroz, mientras se produce el desuerado. La cuajada cortada y parcialmente desuerada se coloca en moldes, que se presan (2 horas, a 2 kg/cm²). Tras el prensado, los quesos se desmoldan y se sumergen en una solución de salmuera (16 % (p/v)) durante 4 horas. La maduración de los quesos se produjo a una temperatura de 5-10° C y una humedad relativa de 85-90 % durante 60 días.

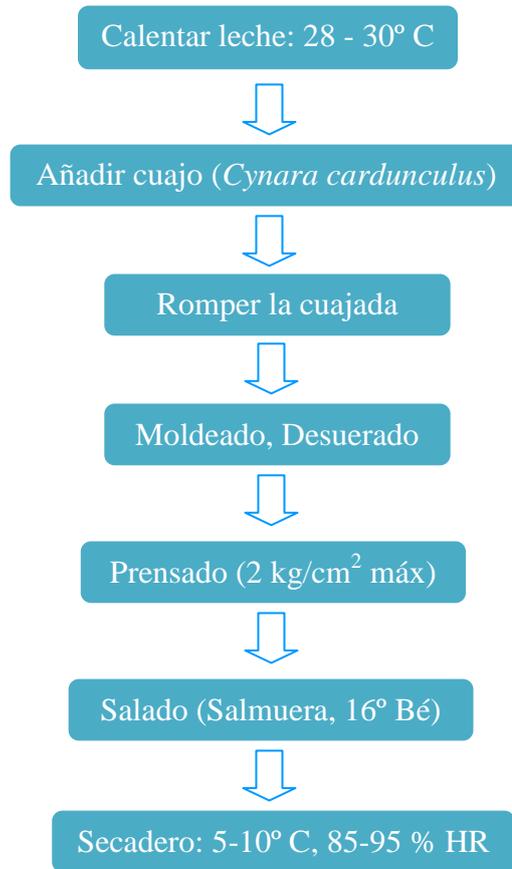


Figura III.10. Proceso de elaboración de los quesos tipo Torta del Casar.

Tabla III.12. Muestras de cardos utilizadas para la elaboración de los diferentes lotes de quesos.

Muestra	Estado de maduración¹	Año	Lote	Localización²
M1	b	2007	L2	Ctra. Mérida-Madrid
M2	a	2007	L3	La Albuera
M3	b	2007	L2	Ctra. Mérida-Madrid
M4	c	2007	L6	Sancha Brava
M5	b	2008	L4	Mérida. Autovía A-V. Cáceres
M6	c	2007	L6	Sancha Brava
M7	b	2008	L1	Canal de Balboa
M8	c	2007	L6	Sancha Brava
M9	c	2007	L3	La Albuera
M10	c	2008	L1	Canal de Balboa
M11	c	2007	L3	La Albuera
M12	a	2007	L3	La Albuera
M13	c	2007	L5	Puebla de la Calzada
M14	b	2008	L4	Mérida. Autovía A-V. Cáceres
M15	a	2007	L3	La Albuera
M16	b	2008	L4	Mérida. Autovía A-V. Cáceres

¹ a: las flores se están abriendo, solo algunos estigmas y estilos son visibles; b: las flores están totalmente abiertas, incluso con polen; c: las flores empiezan a secarse, los estilos y los estigmas son de color marrón.

² Coordenadas geográficas: L1: 38° 54' 8,82" N 6° 43' 59,9" W, L2: 38° 50' 34,8" N 6° 57' 39,73" W, L3: 38° 45' 6,73" N 6° 48' 10,42" W, L4: 38° 57' 0,30" N 6° 16' 53,03" W, L5: 38° 53' 59,94" N 6° 51' 12,43" W, L6: 38° 56' 32,78" N 6° 20' 23,16" W, L7: 38° 54' 23,54" N 6° 47' 37" W.

El tiempo de cuajado se define en este estudio, como el tiempo que tarda en formarse la cuajada y por tanto en procederse al corte de la cuajada. Se determinó visualmente.

Tras la elaboración de los quesos, y antes de comenzar su periodo de maduración, se determinó el rendimiento quesero, como la cantidad de queso, en kg, obtenida a partir de 1 L de leche.

Para la determinación de los diferentes parámetros físico – químicos y microbiológicos de los quesos, se tomaron muestras en tres momentos a lo largo del período de maduración, a los 2 días, a los 30 días, y a los 60 días, cuando se considera finalizada la maduración. En cada uno de estos momentos se tomaron 3 quesos al azar.

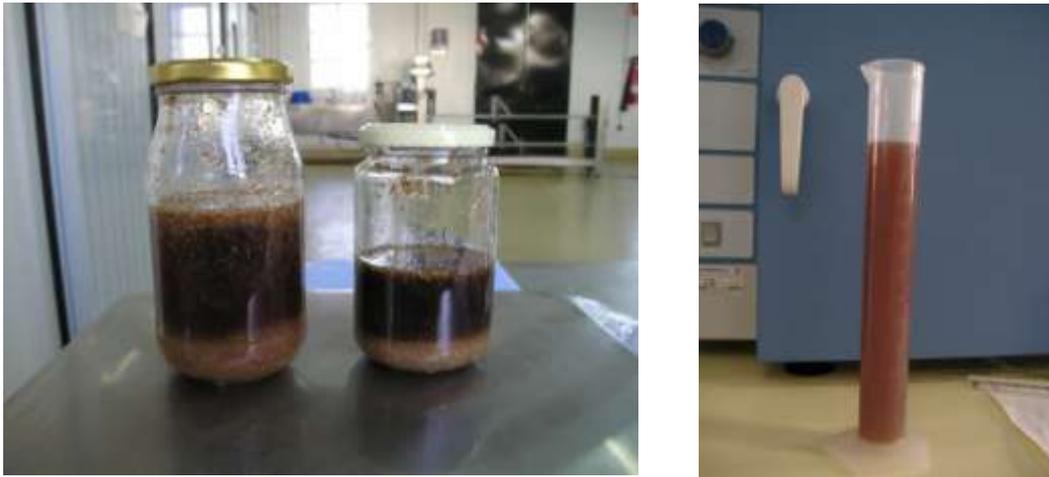


Figura III.11. Preparación de los extractos de flores de *C. cardunculus*, cuajos.



Figura III.12. Calentamiento de la leche y homogeneización en la cuba.



Figura III.13. Corte de la cuajada con las liras en la cuba de elaboración.



Figura III.14. Moldeado y prensado de los quesos.



Figura III.15. Proceso de salado de los quesos, mediante sumersión en salmuera.



Figura III.16. Quesos identificados en el secadero durante el periodo de maduración.



Figura III.17. Quesos elaborados tras 30 días de maduración.



Figura III.18. Quesos elaborados tras 60 días de maduración.



Figura III.19. Quesos elaborados tras 60 días de maduración.

III.2.15. Análisis de los parámetros físico – químicos

Los análisis físico – químicos se realizaron sobre la leche con la que se elaboraron los quesos, sobre los cuajos empleados, y sobre todas las muestras de queso recogidas durante el proceso de maduración (a los 2, 30 y 60 días).

- **Determinación del pH**

El pH se determinó en los extractos de cardo o cuajos, en la leche para la elaboración de los quesos, y en los quesos.

Las medidas del pH se realizaron según se describe en la Norma ISO 2917: 1999, introduciendo el electrodo del pHmetro calibrado en un homogenizado de cuajo, leche o queso.

- **Acidez**

La acidez de la leche se mide mediante una valoración ácido-base, con NaOH 0,1 N, utilizando fenolftaleína como indicador. Se expresa en grados Dornic (° D) o en % de ácido láctico.

- **Mermas**

Las mermas se midieron por diferencia de pesada de 3 quesos de cada lote, desde el principio del período de maduración hasta el final. Para realizar este análisis se utilizaron siempre los mismos quesos. Se considera merma la diferencia entre el peso inicial del queso y el peso del queso a los 60 días de maduración, y se expresa en %.

- **Humedad**

La humedad se determinó según el procedimiento descrito en la técnica de la AOAC (2005), que consiste en desecar la muestra en estufa a 105° C hasta obtener peso constante. Se utilizaron cápsulas de porcelana que se desecaron en una estufa a 105° C. Tras enfriar las cápsulas en un desecador a temperatura ambiente, se pesaron y se añadió 10 g de muestra. A continuación, se llevaron a una estufa donde permanecieron hasta peso constante (aproximadamente 24 horas) a 105 °C, posteriormente se mantuvieron en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente. La determinación de la humedad se realizó por diferencia de pesadas.

- **Actividad de agua**

La actividad de agua fue determinada mediante la utilización de un equipo Novasina con control de temperatura. Las determinaciones se hicieron partiendo de 3 ó 4 g de cada muestra a temperatura de 25 °C y con un tiempo de equilibrado de 30 min.



Figura III.20. Medición de la actividad de agua de las muestras de queso.

III.2.16. Determinaciones microbiológicas

Se realizaron análisis microbiológicos a los extractos de flores utilizados como cuajos, a la leche de partida para la elaboración de los distintos lotes de quesos, y a todos los quesos a lo largo del periodo de maduración de los mismos (a los 2, 30 y 60 días).

III.2.16.1. Preparación de las muestras para análisis microbiológico

En una bolsa con filtro para Stomacher™ modelo 400, previamente tarada, se pesaron 10 g de muestra (en el caso del queso, y 10 ml en el caso de la leche y del cuajo). Añadimos un volumen de diluyente, agua de peptona (1%), igual a nueve veces la muestra para obtener la dilución 10^{-1} (90 ml). Se colocó la bolsa en el Stomacher™ durante 60 segundos. A continuación, se prepararon diluciones seriadas para la siembra en los medios de cultivos utilizados.

III.2.16.2. Recuentos

- **Bacterias aerobias mesófilas y bacterias psicrótrofas**

Para el recuento de bacterias aerobias mesófilas y psicrótrofas se siguió el procedimiento descrito por Pascual y Calderón (1999). La siembra se realizó en placas petri estériles con el medio Plate Count Agar (PCA). A partir de las diluciones se añadió con pipetas 100 μ l sobre la superficie bien seca de agar PCA. El inóculo se extendió con ayuda de varillas de vidrio estériles hasta quedar completamente absorbido por el medio. Las placas se incubaron en posición invertida a 30 °C durante 72 horas y a 7 °C durante 7 días para las bacterias aerobias y psicrótrofas, respectivamente.

Para los recuentos, se eligieron las placas que presentaron entre 30 y 300 colonias. Se contó todas las colonias de la placa con el contador de colonias y se multiplicaron por el factor de dilución. El resultado se expresó en logaritmos de unidades formadoras de colonias por gramo (log ufc/g).

- **Bacterias ácido lácticas**

El recuento de las bacterias ácido lácticas se realizó según recomendaciones de la APHA (1976). La siembra se realizó en placas petri estériles con el medio agar para

recuento de lactobacilos (MRS), acidificado con una solución de ácido acético al 10%. A partir de las diluciones decimales se añadió con pipetas 100 µl sobre la superficie bien seca de agar MRS. El inóculo se extendió con ayuda de varillas de vidrio estériles hasta quedar completamente absorbido por el medio. Las placas se incubaron en posición invertida a 37 °C durante 48 horas en condiciones de anaerobiosis (10% CO₂).

Finalizada la incubación, se efectuó el recuento de las bacterias y se multiplicó por el factor de dilución de la placa contada, expresándolo en logaritmos de unidades formadoras de colonias por gramo (log ufc/g).

- **Cocos gram + catalasa +**

Para el recuento de estafilococáceas y micrococáceas se realizó en los medios de agares Baird Parker (BP) enriquecido con yema de huevo y telurito potásico y manitol con sal (MSA), respectivamente, según el procedimiento descrito por Pascual y Calderón (1999). El cual, la siembra se realiza a partir de las diluciones decimales, se añadió 100 µl sobre las superficies de BP y MSA. Acto seguido, se extendió el inóculo con ayuda de varillas de vidrio estériles hasta quedar completamente absorbido por el medio. Las placas se incubaron invertidas durante 48 horas a 37 °C para agar BP y a 30 °C en el caso de agar MSA.

Para el recuento, se eligieron las placas que presentara entre 30 y 300 colonias. Se contaron todas las colonias de la placa con el contador de colonias y las multiplicamos por el factor de dilución. El resultado se expresó en logaritmos de unidades formadoras de colonias por gramo (log ufc/g).

La presencia de *S. aureus* se evidenció en el agar BP por la aparición de colonias de color negro azabache, brillante, convexas, de 2-3 mm de diámetro y rodeadas de un halo de precipitación transparente.

- **Enterobacteriaceae totales**

El recuento de enterobacterias totales se realizó en el medio de cultivo agar bilis glucosa rojo neutro cristal violeta (VRBG) se siguió el procedimiento descrito en medio sólido por Pascual y Calderón (1999). A partir de las diluciones decimales se añadió 100 µl sobre la superficie bien seca de agar VRBG. El inóculo se extendió con ayuda de

varillas de vidrio estériles hasta quedar completamente absorbido por el medio. Las placas se cubrieron con 10-15 ml adicionales del mismo medio (doble capa), a fin de evitar el crecimiento excesivo y la extensión de las colonias, lo que facilita su recuento. Las placas se incubaron en posición invertida a 37 °C durante 24 horas.

Se eligieron las placas que presentaban entre 30-300 colonias de color violeta rojizo por fermentación de la glucosa con formación de ácido rodeadas de un precipitado también de color violeta por fermentación de los ácidos biliares del medio y se calculó el número de unidades formadoras de colonias por el factor de dilución correspondiente. Los resultados se dieron en logaritmos de unidades formadoras de colonias por gramo (log ufc/g).

- **Enterobacteriaceae lactosa positiva (coliformes)**

El recuento de enterobacterias lactosa positiva se realizó en el medio de cultivo agar bilis lactosa rojo neutro cristal violeta (VRBA) se siguió el procedimiento descrito por Pascual y Calderón (1999). A partir de las diluciones decimales se añadió con pipetas 100 µl sobre la superficie bien seca de agar VRBA. El inóculo se extendió con ayuda de varillas de vidrio estériles hasta quedar completamente absorbido por el medio. Las placas se cubrieron con 10-15 ml adicionales del mismo medio (doble capa), a fin de evitar el crecimiento excesivo y la extensión de las colonias, lo que facilita su recuento. Las placas se incubaron en posición invertida a 30±1 °C durante 24 horas.

Las sales biliares y el cristal violeta del medio inhibe la población microbiana Gram positiva, apareciendo colonias (>0,5 mm de diámetro) de color rojo púrpura rodeadas de una zona de precipitación de color violeta, debido a la fermentación de la lactosa y a la precipitación de las sales biliares. Para el recuento se eligieron las placas que contenían entre 30-300 colonias típicas, expresando los resultados en logaritmos de unidades formadoras de colonias por gramo (log ufc/g). Para la confirmación se transfirieron cinco colonias típicas de cada placa a tubos que contenían un 2% de caldo verde brillante lactosa bilis (BGBL), se incubaron a 32 °C durante 24 horas. La reacción se consideró positiva cuando se observó presencia de gas en la campana de fermentación, por lo menos en 1/10 parte de su volumen como consecuencia de la fermentación de la lactosa con formación de ácido y gas en presencia de sales biliares.

- **Escherichia coli**

Para determinar la presencia de *Escherichia coli* se siguió el procedimiento descrito por Pascual y Calderón (1999). Se partió de los resultados obtenidos de *Enterobacteriaceae* lactosa positivas (coliformes), confirmándolos en agar eosina azul de metileno (LEVINE). Para ello se procedió a sembrar con un asa de siembra estéril en la superficie bien solidificada de las placas con el agar, incubando a 44,5 °C durante 24-48 horas.

Las colonias de *E. coli* sobre agar levine miden 2-3 mm de diámetro, son planas o ligeramente cóncavas, con centro oscuros, casi negros y en un elevado número de casos, al reflejarse la luz sobre ellas se observa un brillo metálico verdoso. Las muestras que presentaban crecimiento en agar Levine las considerábamos positivas de *E. coli*.

- **Mohos y Levaduras**

El recuento de levaduras y mohos se realizó según recomendaciones de la APHA (1985). La siembra se realizó por homogenización en masa, se añadió en placas de Petri estériles 1 mL de las diluciones. Posteriormente se adicionaron unos 15 mL de agar con glucosa y patata (PDA) acidificado con una solución de ácido tartárico al 10%.

Una vez las placas sembradas y solidificadas, se llevaron a incubación a 25 °C durante 5 días, y transcurrido ese tiempo se seleccionaron aquellas placas cuyo número de colonias esté comprendido entre 0 y 30 (0 y 50) y se realizó por separado el recuento de mohos y levaduras.

Los resultados los expresamos en logaritmos de unidades formadoras de colonias por gramo (log ufc/g) tanto en el caso de recuentos de mohos como de levaduras.

- **Clostridium sulfito-reductores**

La determinación de *Clostridium* sulfito-reductores se realizó según la norma ISO 15213: 2003. De cada dilución se sembró 1 mL en tubos con agar sulfito sódico, polimixina, sulfadiazina (SPS) licuado y regenerado a 47-50 °C. La siembra se llevó a cabo introduciendo la pipeta con el inóculo hasta el fondo del tubo y depositándolo lentamente de abajo a arriba. Una vez solidificado el medio, se colocó una capa de 2-3 ml del medio

SPS en la superficie y se incubó a 46 °C durante 24-48 horas en condiciones de anaerobiosis.

Pasado el tiempo de incubación, el número de colonias negras debido a la formación de sulfuro ferroso a partir de sulfito crecidas en los tubos se multiplicó por el factor de dilución y así obtuvimos el número de esporos de *Clostridium* sulfito-reductasa por gramo de muestra.

- **Salmonella spp.**

La investigación de *Salmenella* spp. en 25 g de muestra se realizó según la norma ISO 6579: 2002 que incluye tres etapas fundamentales:

- Preenriquecimiento: en bolsas de Stomacher estériles se pesaron 25 g de muestra. Se añadieron 225 mL de agua de peptona tamponada (BPW) y se homogenizaron durante 2 minutos. Se incubó dicha mezcla a 30-35 °C durante 24 horas.

- Enriquecimiento selectivo: tras la incubación se pipeteó 1 mL del cultivo de preenriquecimiento en tubos que contenían 100 mL de caldo tetrionato-bilis-verde brillante (Müller-Kauffmann), y se incubó a 42-43 °C durante 24 horas.

- Siembra en medio de agar selectivo para salmonela: se procedió a sembrar con un asa de siembra estéril en la superficie bien solidificada de las placas de agar xilosa lisina desoxicolato (XLD), se incubó a 37 °C durante 24 horas.

Los resultados se expresaron como presencia o ausencia de *Salmonella* en 25 g de muestra.

- **Listeria spp.**

La investigación de la presencia de *Listeria* se desarrollaron las fases sucesivas siguientes (Roberts y col., 2000):

- Pre-enriquecimiento: en bolsas de Stomacher estériles se pesaron 25 g de muestra. Se añadieron 225 mL de agua de peptona tamponada (BPW) al 1% y se homogenizaron durante 2 minutos. Se incubó dicha mezcla a 30 °C durante 24 horas.

- Enriquecimiento selectivo: en medio líquido selectivo con una concentración completa de agentes selectivos (Caldo triptona soja-extracto de levadura: TSB-YE), se pasó 100 µl del homogeneizado anterior a un tubo que contenía 10 ml de caldo TSB-YE e incubar a 30 °C durante 48 horas.

- Siembra en medio sólido selectivo: se procedió a sembrar con un asa de siembra estéril en la superficie bien solidificada de las placas de agar Palcam, se incubó a 30 °C durante 24 horas.

Los resultados se expresaron como presencia o ausencia de *Listeria* spp en 25 g de muestra.

III. 2.17. Análisis de las proteínas del lactosuero y las caseínas

III.2.17.1. Preparación de los extractos de proteínas del lactosuero y las caseínas

Las fracciones de proteínas del lactosuero se extrajeron de los quesos elaborados siguiendo el procedimiento descrito por Enne y col. (2005). Las muestras (2 g) fueron homogeneizadas (2 ciclos de 1 min cada uno) en agua doblemente destilada (5 ml) con un homogeneizador Ultraturax (Ika®-Werke, Staufen, Germany). Dado que en esta fase se genera calor, se requiere un estricto tiempo de optimización para evitar la degradación de las proteínas del lactosuero. Las muestras homogeneizadas fueron descremadas mediante centrifugación (3000 rpm durante 20 min a 4° C). Nos quedamos con el sobrenadante, donde se encuentran las proteínas del lactosuero. Se guardan a -80° C hasta que son analizadas.

Las caseínas fueron obtenidas a partir de 1 g de muestra de queso, por precipitación a pH 4,3, mediante la adición de 10 ml de buffer acetato - amonio 1 M (Veloso y col., 2004). Se mantuvo la suspensión resultante durante 20 min a 8° C. Después las muestras fueron centrifugadas durante 15 min a 3000 g a 4° C, para recuperar las caseínas precipitadas. Las caseínas fueron diluidas en 10 ml de buffer acetato - amonio 1 mM (pH 4,3), precipitadas de nuevo y centrifugadas durante 10 min a 3000 g a 4° C. Este paso se repite dos veces. Para eliminar la grasa sobrante, las muestras se lavan con 5 ml de acetona y se dejan secar a temperatura ambiente.

Finalmente, las caseínas secas se guardaron en un desecador a - 80° C hasta que fueron analizadas.

III.2.17.2. Determinación de la concentración de proteínas y geles de poliacrilamida (SDS y UREA-PAGE)

La concentración de proteínas se determinó siguiendo el método de Bradford, usando 100 µl de extractos de proteínas solubles.

La hidrólisis de proteínas del lactosuero fue determinada mediante SDS-PAGE (Mini-PROTEAN 3 system, Bio-Rad, Hercules, CA). Para ello, las proteínas del lactosuero se separaron, empleando un gel de acrilamida discontinuo, con un gel concentrador al 4 % y un gel separador al 15 % de acrilamida. Las muestras (15 µl) fueron desnaturalizadas mediante cocción durante 5 min en buffer Tris-HCl 0,0625 M, a pH 6,8 con glicerol 20 %, SDS 2 %, y 2-mercaptoetanol, 5 %. El voltaje se mantuvo constante a 90 mV para el gel concentrador y a 150 mV para el gel separador. Las proteínas se visualizaron mediante tinción con azul brillante Comassie R-250 (0,25 % p/v) en metanol 50 % (v/v) y ácido acético (10 %) (v/v). El exceso de tinción se eliminó destiñendo con una solución de metanol 20 % (v/v) y ácido acético 5 % (v/v). Como patrón de utilizó un marcador molecular de 205 kDa a 6,5 kDa (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA). El análisis densitométrico de los geles se llevó a cabo con un programa informático de análisis de imágenes (Genetools, SynGene, Cambridge, United Kingdom).

La hidrólisis de caseínas fue determinada por la técnica UREA-PAGE (Mini-PROTEAN 3 system, Bio-Rad, Hercules, CA). Se emplearon geles de acrilamida discontinuos, compuestos por un gel concentrador (4 %) y un gel separador (15 %). El buffer del gel concentrador era tris(hidroximetil)aminometano 0,06 M (Tris), urea 8 M a pH 6,8, y el buffer del gel separador era Tris 0,76 M, urea 8 M a pH 8,8. El buffer de electroforesis era una solución de Tris 0,02 M, glycine 0,19 M. Las muestras de caseínas (5 µl) fueron desnaturalizadas mediante cocción durante 5 min en buffer Tris-HCl 0,0625 a pH 6,8 con urea 10 M, glicerol, 20 % y 2-mercaptoetanol, 5 %. El voltaje se mantuvo constante a 90 mV para el gel concentrador y a 150 mV para el gel

separador. Las proteínas se visualizaron mediante tinción con azul brillante Comassie R-250 (0,25 % p/v) en metanol 50 % (v/v) y ácido acético (10 %) (v/v). El exceso de tinción se eliminó destiñendo con una solución de metanol 20 % (v/v) y ácido acético 5 % (v/v). Como patrón se utilizó la mezcla de caseínas bovinas (Sigma Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA (α , β and κ)) a una concentración de 0,5 mg/ml de cada caseína, disueltas en 5 ml de agua destilada. El análisis densitométrico de los geles se llevó a cabo con un programa informático de análisis de imágenes (Genetools, SynGene, Cambridge, United Kingdom).

III.2.18. Determinación del nitrógeno total

Se realizó la determinación del nitrógeno total por el método de Kjeldahl. Las muestras de quesos picados (1 g) se colocaron en tubos Kjeldahl y se mezclaron con 15 g de K_2SO_4 , 0,5 g de $CuSO_4$, una punta de espátula de selenio y 20 ml de H_2SO_4 . Posteriormente se colocaron en el digestor a 420° C, para llevar a cabo el proceso de digestión o mineralización, hasta que los tubos estuvieron de color verde esmeralda.

Una vez terminado el proceso de digestión se dejó enfriar 10 minutos y a continuación, se le añadieron 100 ml de agua destilada a cada uno de los tubos Kjeldahl.

Se utilizó el Kjeltex System para llevar a cabo el proceso de destilación. Para ello, se colocó cada tubo en el destilador y se le añadió NaOH al 35 %. Por otro lado, en otra parte del destilador se colocó un matraz con 100 ml ácido bórico al 2 % y unas gotas de indicador rojo de metilo-verde de bromocresol.

Por último, una vez terminado el proceso de destilación se llevó a cabo una valoración HCl 0,1 N.

III.2.19. Determinación del nitrógeno no proteico y nitrógeno aminoacídico

Se determinó el nitrógeno no proteico mediante el método siguiendo los métodos descritos por Johnson y de Moore y Steine para el nitrógeno no proteico y aminoacídico, respectivamente, ambos descrito por Córdoba (1990).

III.2.19.1. Preparación del extracto

Para la determinación tanto del nitrógeno no proteico y como del nitrógeno aminoacídico se preparó un extracto común (De Ketelaere y col., 1974). Se realizó un homogeneizado de 4 g de muestra con 20 ml de ácido perclórico 0,6 N, seguidamente se centrifugó durante 15 min a 4000 rpm, se filtró el sobrenadante con papel Whatman nº 54, y se lavó el residuo con 5 ml de ácido perclórico 0,6 N. El filtrado se ajustó a pH 6 con hidróxido potásico al 30%, filtrándose para eliminar el perclorato potásico y enrasándose a 30 ml con agua destilada.

III.2.19.2. Cuantificación del nitrógeno no proteico (NNP)

El NNP se cuantificó mediante el método de Johnson, descrito por Córdoba (1990). Se fundamenta en la reacción de los compuestos nitrogenados con ioduro potásico mercúrico (Reactivo de Nessler) para dar, en solución alcalina, un complejo de color naranja que se mide en un espectrofotómetro a 490 nm.

Para su determinación se desecó en un baño de arena a 120 °C un tubo de ensayo que contenía 0,1 ml del extracto exento de proteínas preparado anteriormente. A continuación, se añadió 0,2 ml de ácido sulfúrico concentrado y se digirió a 120 °C en un baño de arena, donde se mantuvo el tiempo suficiente para que la solución fuese transparente. Sucesivamente, se añadió 4,8 ml de agua destilada, 3 ml de NaOH 4 N y 2 ml de reactivo de Nessler. Se agitó y se dejó reaccionar durante 10 min. Transcurrido este tiempo se midió la absorbancia refiriendo los resultados de las lecturas colorimétricas a una recta patrón elaborada con una solución de sulfato amónico.

III.2.19.3. Cuantificación del nitrógeno aminoacídico (NA)

En primer lugar se procedió a la precipitación de los péptidos del extracto. Para ello, se tomaron 5 ml del extracto preparado anteriormente, como se describe en el apartado III.2.19.1., y se añadieron 5 ml de ácido sulfosalicílico al 10%. Se dejó al menos durante 17 h en reposo a una temperatura entre 0-1° C. Seguidamente, se ajustó a pH 6 con NaOH 4 N y se filtró. Finalmente se llevó a un volumen de 25 ml con agua destilada. El NA se determinó según el método de Moore y Steinie, tal como describe Córdoba (1990). Del extracto obtenido anteriormente se cogieron 0,5 ml y se añadieron

1,5 ml de reactivo de ninhidrina (2 g de ninhidrina y 0,3 g de hidridantina disueltos en 75 ml de etilenglicol monometiléter y 25 ml de tampón acetato sódico 4 N a pH 5,5). A continuación se agitó y se mantuvo durante 20 min en un baño de agua hirviendo. Posteriormente, se enfrió y se añadieron 8 ml de 1-propanol al 50%. Finalmente se midió la absorbancia, a 570 nm, tras 10 min en oscuridad para favorecer el desarrollo del color. Para este análisis se elaboró una recta patrón con concentraciones crecientes del aminoácido leucina.

III.2.19.4. Índices de proteólisis

Se establecieron dos índices para expresar el grado de proteólisis provocada en los quesos a lo largo del periodo de maduración. Por un lado se calculó el índice IP (índice de proteólisis), que relaciona el NNP y el Nitrógeno Total, y por otro lado el IGA (índice de generación de aminoácidos), con el que se relaciona el NA y el NNP. Ambos índices se expresaron en % y se calcularon a los 2, 30 y 60 días de maduración.

III.2.20. Determinación de aminas biógenas

Para la detección de aminas biógenas en los quesos madurados, a los 60 días, se prepararon las muestras siguiendo el método descrito por Krížek y Pelikánová (1998). Para ello, se utilizó 10 gr de muestra previamente picada, que se homogenizó con 75 ml de HClO₄ 0,6 M durante 1 hora. Posteriormente, la mezcla fue filtrada mediante papel de filtro y se lavó con HClO₄ 0,6 M ajustando el volumen final a 100 ml. De ellos, 5 ml fueron transferidos a un tubo de ensayo y añadimos 125 µl de una solución del patrón interno 1,7-heptanediamina (400 mg/l). La mezcla es entonces neutralizada añadiendo 1 ml de una solución de NaOH 9,8 M. Después de agitar, se añadieron 100 µl de cloruro de benzoilo al 99% agitando de nuevo los tubos de ensayo durante 2,5 minutos. Luego se deja en un ultrasonido durante 15-20 minutos. Seguidamente, se añadieron 2,5 g de NaCl y los tubos se agitaron durante 1 minuto.

Por último se realizaron dos lavados con 3 ml de dietil éter, se recogió la fase superior y se evaporó mediante corriente de nitrógeno, resuspendiendo los residuos en 400 µl de metanol-agua (1:1 v/v).

El análisis de las aminas biógenas fue realizado mediante electroforesis capilar BECKMAN Pace System serie 5500 (Benito y col., 2007; Martín y col., 2007), utilizando columnas suministradas por Beckman, silanizadas, de 75 µm de diámetro y 37 cm de longitud total. El capilar primero se lavó con 0,2 M de NaOH durante 10 minutos y agua desionizada durante 5 minutos. Después de cada carrera, la columna capilar fue condicionada con lavados de 0,2 M de NaOH durante 2,5 minutos, agua desionizada durante 2,5 minutos y 15 mM de tetraborato sodico, 40mM de SDS, y 25% (v/v) de metanol a pH 9,45 durante 3 minutos. El último buffer fue utilizado como el buffer de separación de Krížek y Pelikánová (1998). Las muestras fueron inyectadas durante 3 segundos a una presión de 0,5 psi y separadas a 405 V/cm (15 kV) durante 3,5 minutos a 30 °C. Las carreras fueron monitorizadas a 214 nm con un detector diode array. La identificación de las aminas biógenas se realizó a partir del tiempo de retención. Patrones de tiramina, triptamina, cadaverina, putrescina, histamina, espermidina y espermina fueron utilizados para confirmar la identificación.

III.2.21. Extracción y cuantificación de la grasa

La extracción de grasa se realizó a los quesos elaborados al final de la maduración (60 días). Se llevó a cabo mediante el método descrito por Bligh y Dyer (1959), con algunas modificaciones.

Inicialmente fueron pesados 5 g de muestra, previamente picada, y se homogenizaron con 15 ml de cloroformo: metanol en proporción 1:2, en un tubo de centrífuga. Las muestras se homogenizaron durante 2 minutos y a continuación, se centrifugaron a 6000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se recogió en un tubo de centrífuga y el sedimento se lavó con 5 ml de cloroformo, que se homogenizó durante 30 segundos a la misma velocidad, y se centrifugó con las anteriores condiciones; se recogió nuevamente y se unió en el tubo de centrífuga al obtenido anteriormente, con lo que la relación final quedó de 2:2 (cloroformo: metanol). Posteriormente se realizó un lavado con 5 ml de agua con un 0,8 % de NaCl. Después de una breve agitación, se volvió a centrifugar a 6000 rpm durante 5 minutos, obteniéndose dos fases claramente diferenciadas, recogiendo la superior con pipeta automática y pasteur. La fase inferior (con la grasa) se pasó a un matraz erlenmeyer de boca esmerilada, a través de un filtro con

sodio sulfato anhidro. Posteriormente se procedió a la evaporación del cloroformo en un rotavapor, recuperando la grasa con un poco del mismo en un vial previamente pesado. El cloroformo utilizado para recuperar la grasa fue evaporado del vial a través de una corriente de nitrógeno. Los viales fueron pesados antes y después de la adición de la grasa, pudiendo hacer posible la cuantificación de la grasa por diferencia de pesadas.

III.2.22. Determinación del índice de acidez

El índice de acidez se determinó mediante el método recogido en la norma ISO 660 (2009) a las muestras de queso a los 60 días de maduración, para ello, se pesaron 500 mg de grasa en un eppendorf y se disolvieron en 0,25 ml de la mezcla de disolventes neutralizada (éter dietílico y etanol 1:1 neutralizado con KOH 0,01 N). Se añadieron 20 µl de fenolftaleína al 1 % y se valora con la disolución de KOH 0,01 N, hasta coloración roja permanente. Una vez conseguida la coloración roja, el índice de acidez lo calculamos con la siguiente fórmula:

$$IA = (A \times C \times Pm) / Gr$$

A: ml de disolución de KOH (0,01 N) gastados

C: concentración de la disolución de KOH en mol/l

Pm: masa molar del KOH

Gr: peso en g de la muestra (grasa).

III.2.23. Determinación del contenido en malondialdehído (MDA) mediante el test de ácido tiobarbitúrico (TBA)

El grado de oxidación lipídica se determinó a los quesos de los diferentes lotes elaborados a los 60 días de maduración mediante el test del ácido tiobarbitúrico (TBA), siguiendo el procedimiento descrito por Jørgensen y Sørensen (1996). Inicialmente se pesaron 3 gr de queso picado en tubos de centrífuga. Posteriormente se añadieron 9 ml de ácido tricloroacético (TCA, 1 gr de propilgalato, 1 gr de ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), y 75 gr de TCA por litro de agua mQ) y se homogeneizó durante 45 segundos. A continuación las muestras se centrifugaron

durante 5 minutos a 10000 rpm y se filtraron durante 10 minutos. De cada muestra se tomaron dos tubos de rosca a los que se les añadieron 3 ml del filtrado a cada uno. Seguidamente se añadieron 3 ml de TBA (288,3 mg por cada 100 ml de agua mQ). Posteriormente se introdujeron los tubos en un baño con agua a 100° C durante 40 minutos. Transcurrido este tiempo, se enfriaron los tubos y se centrifugaron a 4500 rpm durante 10 minutos. Una vez terminado el proceso, se llevó a cabo la medición de la absorbancia en un espectrofotómetro a dos longitudes de onda, 532 y 600 nm. El blanco estaba compuesto de 3 ml de TCA y otros tantos de TBA.

III.2.24. Determinación de compuestos volátiles

Para la extracción, separación, identificación y cuantificación de los compuestos volátiles de los quesos al final de la maduración (60 días) se utilizó un sistema de espacio de cabeza dinámico automatizado acoplado a un cromatógrafo de gases con detector selectivo de masas.

Para su extracción se utilizó una fibra de microextracción en fase sólida de 75 µm de diámetro de carboxen-polidimetilsilosano (Ruiz y col., 1998). Se utilizaron 0,5 g de muestra picada de los quesos que se introdujeron en un vial sellado por un septum. Tras la perforación del septum por el sistema de inyección de la fibra, ésta fue expuesta a la muestra durante 55 min a 40° C para obtener una óptima extracción de los compuestos volátiles. La temperatura se consiguió sumergiendo dos tercios de vial en un baño a temperatura regulable durante la extracción.

Tras la extracción de los volátiles la fibra fue inmediatamente llevada al inyector del cromatógrafo de gases para el análisis de los volátiles captados.

Las condiciones cromatográficas empleadas para la separación de los compuestos volátiles se exponen a continuación:

Tabla III.13. Condiciones cromatográficas

Temperatura inicial del horno:	35 °C - 5 min
Rampa de temperatura:	4 °C/min hasta 150 °C
	20 °C/min hasta 250 °C

	250 °C-5 min
Temperatura de la interfase:	180 °C

Para la obtención del espectro de los distintos compuestos volátiles las condiciones del detector selectivo de masas fueron las siguientes:

Tabla III.14. Condiciones del detector selectivo de masas

Impacto electrónico:	70 eV
Electrón multiplicador voltio (emv):	1756 V
Recogida de datos:	1 scan/seg.
Rango de iones:	20-365

La identificación de los compuestos volátiles se realizó mediante su espectro de masas así como por su índice de Kovats calculado a partir del tiempo de retención del pico con respecto al de los patrones de alcanos.

III.2.25. Determinación de aniones de los quesos

La determinación de los aniones cloruro sódico, acetato y lactato se llevó a cabo mediante electroforesis capilar en zona (CZE), utilizando el equipo PACE 5500 (Beckman Instrument, Inc. Palo Alto, CA, USA) equipado con columnas de 50 mm de diámetro, 27 cm de longitud total (20 cm hasta la ventana del detector) suministradas por Supelco (Tecknocroma, Barcelona, España). Se siguió el método descrito por O'Flaherty et al. (2001) para el análisis de aniones inorgánicos y orgánicos. Previamente al análisis, la muestra homogeneizada con agua destilada (1:50 p/v) se filtró a través de un filtro de 0,2 mm.

El capilar en primer lugar se lavó con agua desionizada durante 10 minutos y con buffer fosfato 90 mM (pH 6) (240 mM 2-hydropropyl-b-cyclodextrin) durante 10

minutos. El último buffer fue empleado como buffer de separación. Después de cada carrera, la columna capilar fue condicionada con lavados de agua desionizada durante 5 minutos y con buffer de separación durante 5 minutos. Las muestras fueron inyectadas durante 20 segundos a una presión de 0,5 psi y separadas a 474 V/cm (27 kV) durante 20 minutos a 20 °C. Las carreras fueron monitorizadas a 200 nm con un detector diode array. Los diferentes aniones fueron identificados mediante su tiempo de retención.

III.2.26. Análisis instrumental de la textura

Se llevaron a cabo dos tipos de análisis de textura, utilizando un texturómetro TA.XTA2i (Stable Micro Systems, Godalming, UK).

Por un lado se determinó la textura mediante test de compresión de los quesos a lo largo del periodo de maduración, 2, 30 y 60 días. Se empleó una sonda cilíndrica de 4 mm de diámetro, la cual presiona sobre láminas de queso de 1,5 cm de espesor. Las curvas de fuerza-tiempo fueron registradas a una velocidad de 1 mm/s y 10 mm de distancia. La dureza (g) se define como el máximo pico de fuerza durante el ciclo de compresión, la cohesividad (g s) es el área debajo de la primera curva, la adhesividad (g) se identifica como el máximo pico negativo y el área F-T 2:3 (g s) es el área negativa que encierra la curva.

Por otra parte se midió la untuosidad de los quesos elaborados a los 60 días de maduración. Para ello se utilizó una probeta fija TTC de untuosidad. La parte inferior del cono de la probeta se llenó con la muestra de queso con una espátula. Las curvas se produjeron a una velocidad de 3 mm/s y una distancia de 25 mm. La firmeza (g) y el trabajo de corte (g s) se corresponden con el pico máximo y el área bajo la curva, respectivamente. El máximo pico negativo indica la pegajosidad (g) de la muestra y el área máxima negativa es el trabajo de adhesión (g s).

Estas medidas se realizaron por triplicado, utilizando los tres quesos por lote elaborados.

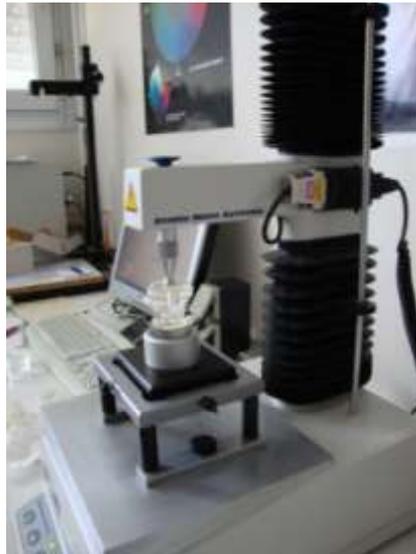


Figura III.21. Medición de la untuosidad de los quesos a los 60 días de maduración.

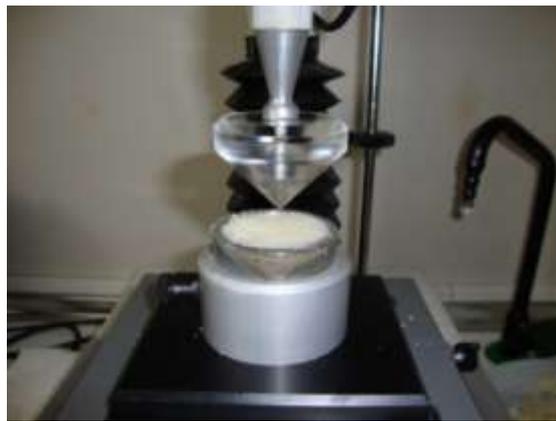


Figura III.22. Medición de la untuosidad de los quesos a los 60 días de maduración.

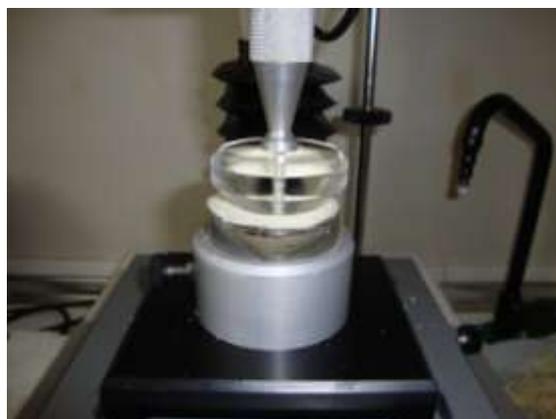


Figura III.23. Medición de la untuosidad de los quesos a los 60 días de maduración.

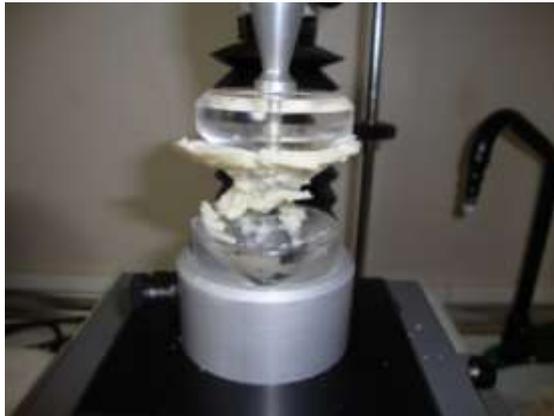


Figura III.24. Medición de la untuosidad de los quesos a los 60 días de maduración.

III.2.27. Análisis sensorial

Para llevar a cabo el análisis sensorial se realizaron las distintas pruebas: test triangular, descriptivo y hedónico. Las pruebas del test triangular y el descriptivo se realizaron con 15 jueces entrenados a los que se les presentaron lonchas finas (0,5 cm) de los diferentes lotes de quesos al final de la maduración (60 días). Para las catas hedónicas, se utilizó un panel compuesto por 17 catadores no entrenados.

III.2.27.1. Test triangular

Esta prueba se realizó según la norma UNE-EN ISO 4120:2004, consistió en presentar a cada juez tres muestras, de las cuales dos eran iguales, teniendo que identificar la muestra que era diferente (Larmond, 1977). Sabiendo que la probabilidad de que el juez acierte al azar es de sólo 33,3%, se asegura que la prueba tiene una buena sensibilidad.

La interpretación de las respuestas se llevó a cabo mediante datos basados en tablas binomiales de $p=1/3$ (Roessler y col., 1978) en las que se suman el número de respuestas correctas y dependiendo del número de jueces se hace la interpretación. En la tabla binomial se encuentra, para el número de jueces que participan en una prueba, el número mínimo de respuestas correctas para establecer diferencia significativa (Larmond, 1977; Roessler y col., 1978).

III.2.27.2. Test descriptivo

Para la realización de este test se siguió la norma UNE 87024-2:1996 (ISO 8586-2:1994). Se seleccionaron una serie de cuestiones referentes a parámetros relacionados con el olor, textura, aroma y gusto de los quesos.

Las percepciones de los catadores fueron señaladas en una escala con un rango de 0 a 12. Los datos fueron integrados automáticamente para su posterior análisis estadístico.

El protocolo de preguntas fue el siguiente:

Se va hacer una serie de preguntas sobre las características del queso. Indique su intensidad sobre la línea continua.

Nombre _____

Fecha _____

Número de muestra

Análisis visual

De la Pasta

Color amarillo

Poco _____ Mucho

Cerrada

Poco _____ Mucho

Elástica

Poco _____ Mucho

Untabilidad

Poco _____ Mucho

Olor

“Leche de oveja”

Poco _____ Mucho

Ácido

Poco _____ Mucho

Textura (tras probar)

Firmeza

Poco _____ Mucho

Cremosidad

Poco _____ Mucho

Viscosidad

Poco _____ Mucho

Jugosidad

Poco _____ Mucho

Gusto

Salado

Poco _____ Mucho

Amargo

Poco _____ Mucho

Picante

Poco _____ Mucho

Ácido

Poco _____ Mucho

Astringente

Poco _____ Mucho

Rancio

Poco ————— Mucho

Aroma (Gusto +olor)

Aroma a “leche de oveja”

Poco ————— Mucho

Intensidad

Poco ————— Mucho

Persistencia

Poco ————— Mucho

Otros aromas

Regusto

Poco ————— Mucho

Desagradable

Poco ————— Mucho

Rancio

Poco ————— Mucho

Otros

Poco ————— Mucho

TIPO

Queso ————— Torta

III.2.27.3. Test hedónico

En este tipo de test, se utilizó un panel de catas no entrenado, compuesto por 17 catadores no entrenados. Las muestras fueron comparadas aleatoriamente evaluando su aceptabilidad en grupos de dos para que todos lotes fueran enfrentados entre sí. La escala de puntuación empleada fue del 0 al 12.

ACEPTABILIDAD

Poco ————— Mucho

III.2.28. Estudio estadístico de los resultados

Las diferencias significativas y los grupos homogéneos de medias se establecieron mediante un análisis de varianza (ANOVA) siguiendo los procedimientos de una vía. Cuando el efecto de la interacción es significativo ($P < 0,05$) se procedió a la realización de un test de comparación de medias por el método TUKEY que determina la diferencia mínima entre las medias de cada grupo para que ésta sea estadísticamente significativa. También se establecieron las relaciones entre los diferentes parámetros estudiados usando para ello la correlación de Pearson. Con el fin de determinar el peso de los diferentes parámetros estudiados en la variabilidad de los lotes ensayados, se realizó un análisis factorial de componentes principales. Para la clasificación de los extractos de las flores en base a su actividad proteolítica se empleó el método jerárquico de cluster.

IV. RESULTADOS

IV.1. CAPÍTULO I

En este capítulo se aborda la caracterización botánica, genética y fenotípica de cardos silvestres, pertenecientes a diferentes especies de la familia Asteraceae, recogidos en Extremadura. Se analiza la aptitud tecnológica de los extractos preparados a partir de estos cardos para su uso como coagulante vegetal en la elaboración de “Torta del Casar”. Estos resultados corresponden al objetivo 1 de este trabajo, y se estructuran en los siguientes artículos:

IV.1.1. DNA typing methods for differentiation of wild cardoon used in the elaboration of “Torta del Casar” cheese.

Enviado a la revista “Journal of Food Science”.

IV.1.2. Characterisation by protein profiles methods for detection of the vegetable rennet (*Cynara cardunculus*) adulteration used in “Torta del Casar” cheese-making.

IV.1.3. Influencia de la preparación y almacenamiento del extracto de *Cynara cardunculus* en su actividad coagulante.

IV.1.1. DNA typing methods for differentiation of wild cardoon used in the elaboration of “Torta del Casar” cheese.

Enviado a la revista “Journal of Food Science”



DNA typing methods for differentiation of *Cynara cardunculus* used in the elaboration of "Torta del casar" cheese

Journal:	<i>Journal of Food Science</i>
Manuscript ID:	JFS-2012-0869
Section:	7-Sensory and Food Quality
Date Submitted by the Author:	26-Jun-2012
Complete List of Authors:	Fernández, Margarita; University of Extremadura, Producción animal y Ciencia de alimentos Ordiales, Elena; Centro Tecnológico Agroalimentario Extremadura (CTAEX), Agricultura Benito, Maria Jose; University of Extremadura, Producción animal y Ciencia de alimentos Martin, Alberto; University of Extremadura, Producción animal y Ciencia de alimentos Hernandez, Alejandro; University of Extremadura, Producción animal y Ciencia de alimentos Ramos, Maria Guia; University of Extremadura, Producción animal y Ciencia de alimentos
Keywords:	cheese, <i>Cynara cardunculus</i> L., RAPD, SSR

SCHOLARONE™
Manuscripts

1 **DNA typing methods for differentiation of *Cynara cardunculus* used in the**
2 **elaboration of “Torta del casar” cheese**

3 Margarita Fernández^a; Elena Ordiales^b; María J. Benito^{a*}; Alejandro Hernández^a;
4 Alberto Martín^a, María G. Córdoba^a

5

6 ^a Nutrición y Bromatología, Escuela de Ingenierías Agrarias, Universidad de
7 Extremadura, Ctra. de Cáceres s/n, 06071 Badajoz, Spain

8 ^b Agricultura, Centro Tecnológico Agroalimentario Extremadura (CTAEX), Ctra.
9 Villafranco a Balboa Km. 1.2, Villafranco del Guadiana, 06195 Badajoz, Spain

10

11

12 *Corresponding author

13 Tel.: +34 924 286200; fax: +34 924 286201

14 E-mail address: mjbenito@unex.es

15 <http://eia.unex.es>

16

17 SUMMARY

18 The purpose of this work was to develop a PCR method for the identification of
19 *Cynara cardunculus* used in the elaboration of "Torta del casar" cheese. 106
20 specimens were collected from different parts of the Extremadura region (Spain).
21 Morphological characterization was performed *in situ* at the time of sampling.
22 Comparison of the morphological data was by genotypic characterization.
23 Different genetic profiles were obtained using 7 random primers with the RAPD
24 technique. The best results for differentiation were obtained with the primer
25 OPAE10. For the SSR technique, 10 microsatellites were used, the best genetic
26 profiles being obtained with the microsatellite CMAFLP-24. All the specimens
27 were analyzed with both primers, showing that the method provided a fast and
28 accurate characterization of *Cynara cardunculus* that could be used for the
29 Protected Designation of Origin "Torta del Casar" as a tool for traceability and
30 control in the process of elaboration of the cheese. This is the first molecular
31 characterization study made in Spain with populations of *C. cardunculus*.

32

33 **Keywords:** cheese, *Cynara cardunculus* L., RAPD, SSR.

34

35 Introduction

36 Cardoon is a non-domesticated robust perennial plant, characterized by its
37 rosette of large spiny leaves, branched flowering stems, and blue-violet flowers. It
38 belongs to the family of *Asteraceae*, tribe *Cynareae*, and is native to the
39 Mediterranean basin, where it colonizes dry and undisturbed areas (Portis and
40 others 2005a). The aspartic proteinases extracted from cardoon flowers of
41 various species of the genus *Cynara* L. (mainly *Cynara cardunculus* and, to a
42 lesser degree, *Cynara humilis*) called 'cynarases' or 'cyprosins' are among the
43 few plant-origin enzymes that have been used as a rennet in cheese making in
44 some Mediterranean countries. Some Spanish, Portuguese, French, and Italian
45 varieties of ewes' milk cheese (Barbosa and others 1976) are made with aqueous
46 extracts of dried flowers from various species of the genus *Cynara* L. It is
47 normally used in the making of Portuguese "Serra" and "Serpa" cheeses (Vieira
48 de Sá and Barbosa 1972; Macedo and others 1993) and Spanish "Los
49 Pedroches", "La Serena", and "Torta del Casar" cheeses (from ewes' milk) as
50 well as "Los Ibores" cheese (from goats' milk) and "Flor de Guía" cheese (from a
51 mixture of ewes' and cows' milk) (Fernández-Salguero and others 1991).
52 Other *Cynara* species, such as *C. humilis* L., are more abundant and also used in
53 the making of various traditional cheeses as a replacement or mixed with *C.*
54 *cardunculus* (Vioque and others 2000). These species are distinguished by their
55 conventional morphological descriptors (Valdés and others 1987), but when the
56 flowers are separated from the plants they cannot be distinguished.
57 The enzymes in these species vary in activity (Pires and others 1994; Fernández-
58 Salguero and Gómez, 1997). High levels of proteolytic enzymes in the flowers of

59 these cardoons are responsible for the effective clotting of the milk (Cordeiro and
60 others 1992).

61 “Torta del Casar” cheese is a semi-hard Spanish variety, recognised as the
62 Protected Designation of Origin “Torta del Casar” (Casar de Cáceres, Cáceres,
63 Spain). It is manufactured from raw Merino ewes’ milk coagulated with vegetable
64 rennet extracted only from *Cynara cardunculus* L. (cardo) flowers. This cheese
65 is ripened for about 2 months. During that period, various physical, chemical,
66 microbiological, and organoleptic changes endow it with a peculiar aroma and
67 creamy flavour (particularly due to the use of the appropriate vegetable rennet)
68 that is highly appreciated in the region. The great heterogeneity of the rennet
69 used in “Torta del Casar” manufacture has a negative influence on the cheese’s
70 quality parameters, including low yield, lack of homogeneity of relevant sensorial
71 factors between batches, etc., that can lead to significant economic losses. In this
72 sense, it is necessary to establish a quality control method for the rapid
73 differentiation of dried flowers of *Cynara cardunculus*, L. from those of other
74 species.

75 Techniques based on nucleic acids are a quick, economic, and safe method for
76 the characterization of plants. Specifically, DNA markers are widely established
77 for food authenticity purposes involving detection of plant material. Molecular
78 markers such as random amplified polymorphic DNAs (RAPD) (Lanteri and
79 others 2001; Sonnante and others 2002), amplified fragment length
80 polymorphism (AFLP) (Lanteri and others 2004b; Pagnotta and others 2004;
81 Sonnante and others 2004a,b), simple sequence repeats (SSRs) (Acquadro and
82 others 2003; Sonnante and others 2004b; Acquadro and others 2005a,b), and
83 inter-simple sequence repeat (ISSR) (Lanteri and others 2004a; Pagnotta and

4

84 others 2004) have been developed for the genetic mapping of globe artichoke
85 species.

86 Diversity assessments based on ISSR, RAPD, and AFLP have been described
87 for the globe artichoke types "Romanesco" (Pagnotta and others 2004; Trionfetti
88 Nisini and others 2007), "Spinoso sardo" (Lanteri and others 2001), "Violetto di
89 Sicilia" (Raccuia and others 2004; Portis and others 2005a), and "Spinoso di
90 Palermo" (Portis and others 2005a), and in both the cultivated and the wild
91 cardoon (Sonnante and others 2004a; Portis and others 2005b,c). Where AFLP
92 and ISSR have been used to generate DNA fingerprints from single plants
93 (Lanteri and others 2004a), a substantial level of variability has been
94 demonstrated within morphologically uniform populations. However, there have
95 been no studies of *Cynara cardunculus*'s molecular characterization in Spanish
96 populations.

97

98 In this sense, PCR techniques have the potential of being an appropriate method
99 to clear characterize *Cynara cardunculus* used to obtain vegetable rennet in the
100 production of "Torta del Casar" cheese. The aim of the present work was to apply
101 the PCR methods RAPD and SSRs for a rapid and accurate differentiation of
102 *Cynara cardunculus* to avoid the problems with the conventional morphological
103 descriptors of the flowers used to obtain the rennet, and to be used as an
104 effective tool for traceability by the authorities of the Protected Designation of
105 Origin in the production of the "Torta del Casar" cheese.

106

107 **Materials and Methods**

108

109 *Plant material*

110 A total of 106 specimens of different species from Asteraceae family were
111 collected in different places of the Extremadura region (Spain). They were
112 separated into batches by morphological identification, performed *in situ* at the
113 time of sampling (Table 1). Photographs were taken of the plants, and the
114 classification was done according to Valdés and others (1987) for the
115 descriptions of relevant morphological features of these species and varieties.

116 Leaf materials of each sample were put into plastic bags, and kept under dry
117 conditions prior to assay in the laboratory.

118 Standard of these plants were obtained from the Research Service and
119 Technological Development, Finca 'La Orden', (Badajoz, Spain), for *Cynara*
120 *cardunculus* (CQ3-08, CQ4-08, CQ5-08), *Cynara humilis* (08), and *Onopordum*
121 *nervosum* (07). These were the reference plants used in this work.

122

123 *DNA isolation*

124 The thistles' flowers were triturated in a mincer followed by grinding in a mortar.
125 DNA was isolated according to the method which includes CTAB as detergent in
126 the extraction buffer described by Porebski and others (1997) with the
127 modifications of Hernández and others (2010). The samples were incubated at
128 65°C for 30 min with 10 ml of extraction buffer (100 mM Tris-HCl (pH 8), 20 mM
129 EDTA, 3 M NaCl, 2% (w/v) CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), and 0.2%
130 (v/v) of β -mercaptoethanol. The concentration and purity of the extracted DNA
131 were measured spectrophotometrically, and brought to a final value of 10 ng/ μ l
132 (Biophotometer, Eppendorf AG, 22331 Hamburg, Germany).

133

134 *RAPD-PCR analysis of the DNA*

135 The amplification of the RAPD-PCR was carried out under the following
136 conditions. Each 30 μ l of reaction mixture contained 10 ng template DNA, 10 mM
137 Tris-HCl, pH 9.0, 3 mM $MgCl_2$, 0.2 mM each of dATP, dCTP, dGTP, and dTTP,
138 200 ng of primer, and 1 U DNA polymerase (Biotools, Madrid, Spain). A total of 7
139 RAPD-PCR primers were used (Table 2). Reaction without template DNA was
140 used as the negative control in all amplifications. Amplification was performed in
141 a MyCycler thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) with the following
142 cycling conditions: one cycle of 94°C for 3 min; 35 cycles of 94°C for 30 s,
143 annealing temperature of 45°C for 1 min and 72°C for 1 min; and a final extension
144 of 72°C for 5 min. The amplification products were separated by electrophoresis
145 in 2% (w/w) agarose gels and detected by staining with ethidium bromide (0.5
146 μ g/ml). A DNA molecular size marker VI of 2.1-0.15 kbp (Roche Farma, IN, USA)
147 was used to determine the size of the PCR products. Electrophoretic patterns
148 were compared using Image Analysis Software (Genetools, SynGene,
149 Cambridge, United Kingdom).

150

151 *Simple Sequence Repeat (SSR) analysis of cardoon DNA.*

152 Ten SSR primers (Table 2) were used to amplify the DNA of the thistle species
153 studied. PCR reactions were performed in a final volume of 30 μ l reaction mixture
154 containing 10 ng template DNA, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 2.0 mM $MgCl_2$, 0.2 mM
155 each of dATP, dCTP, dGTP, and dTTP, 0.2 μ M of each primer, and 1 U DNA
156 polymerase (Biotools, Madrid, Spain). Reaction without template DNA was used
157 as the negative control in all amplifications. PCR was performed in a MyCycler
158 thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, CA), programmed for a hot start of 3 min at
7

159 94°C; 35 cycles of 30 s at 94°C, 1 min at the average of the melting temperatures
160 (T_m) of two flanking primers, and 1 min at 72°C; plus a final extension of 5 min at
161 72°C. All amplification products were separated by electrophoresis in 2% (w/w)
162 agarose gels and detected by staining with ethidium bromide (0.5 µg/ml). A DNA
163 molecular size marker VI of 2.1-0.15 kbp (Roche Farma, IN, USA) was used to
164 determine the size of the PCR products. Electrophoretic patterns were compared
165 using Image Analysis Software (Genetools, SynGene, Cambridge, United
166 Kingdom).

167

168 *Data analysis*

169 Each sample was amplified at least five times to verify reproducibility. RAPD-PCR
170 and SSRs products were scored as “presence” or “absence” of the
171 corresponding band and assigned a binary digit of 1 or 0, respectively. A data
172 matrix of individual markers containing the band scoring information was
173 constructed. Similarities among isolates were estimated using the DICE
174 coefficient, with clustering based on the unweighted pair group method using
175 average linkage (UPGMA) (NTSYS-PC version 2.0, Applied Biostatistics, Inc.).

176

177 **Results and Discussion**

178 *Morphological classification*

179 After performing the *in situ* morphological classification according to Valdés and
180 others (1987), it was found that 1 *Sylibum marianum*, 1 *Cirsium arvense*, 9
181 *Onopordun nervosum*, 17 *Cynara humilis*, and 78 *Cynara cardunculus* specimens
182 had been collected (Table 1).

183

184 *Analysis of RAPD-PCR primers with thistle species*

185 Seven primers were used in this study (Table 2). These primers have previously
186 been employed for the characterization of different plant species (Sonnante and
187 others 2002; Lanteri and others 2003; Portis and others 2004; Hernández and
188 others 2010). The samples used to verify the accuracy of the primers were:
189 *Onopordon nervosum* 08 standard, CQ18 sample, *Cynara cardunculus* CQ3-08
190 standard, CQ38 sample, *Cynara humilis* 07 standard, and CQ12 sample.

191 Analysis of 7 RAPD-PCR primers produced a total of 79 distinct bands of PCR
192 among the 3 species of thistle studied: *Onopordum nervosum*, *Cynara*
193 *cardunculus*, and *Cynara humilis* (Table 2). The bands ranged from
194 approximately 168 to 1406 bp. The primers OPB07 and OPG12 used in this study
195 did not show profiles of bands in the *Cynara cardunculus* plants.

196 The OPB06, OPE19, and OPF08 primers showed profiles of different bands for
197 the species studied except for *Cynara cardunculus* for which there were only 3
198 bands which were also found in *Cynara humilis* profiles.

199 Amplifications with the OPF05 primer showed similar profiles in the different
200 samples amplified and the profiles presented low band intensity. Again, this
201 primers were thus considered unsuitable.

202 In contrast, it is interesting that other authors (Lanteri and others 2003; Portis and
203 others 2004; Hernández and others 2010), report adequate profiles with a greater
204 number of bands using some of these primers in their studies with pepper
205 samples.

206 With the primer OPAE10, band profiles were obtained with a large number of
207 bands of appropriate intensity, obtaining different profiles for each species
208 studied. It was found that there were differences between samples belonging to
9

209 the species *Cynara cardunculus* (Figure 1). The bands ranged from
210 approximately 208 to 1193 bp, with a total of 14 polymorphic bands being
211 obtained.

212 Due to this success, the other primers were discarded and the analysis of all
213 samples collected was carried out with primer OPAE10.

214

215 *Analysis of SSR primers with thistle species*

216 To perform the SSR technique, we used 10 microsatellites (Table 3) previously
217 employed by Acquadro and others (2005a,b) for the characterization of natural
218 populations of *Cynara cardunculus* L. The samples used to verify the accuracy of
219 the primers were: *Onopordum nervosum* 08 standard, CQ18 sample, *Cynara*
220 *cardunculus* CQ3-08 standard, CQ38 sample, *Cynara humilis* 07 standard, and
221 CQ12 sample.

222 Analysis of 10 SSR reactions produced a total of 73 different bands among the 3
223 thistle species studied: *Onopordum nervosum*, *Cynara cardunculus*, and *Cynara*
224 *humilis* (Table 3). The bands ranged from approximately 140 to 1523 bp. Six
225 reactions done with the primers CMAFLP-04, CMAFLP-07, CMAFLP-13,
226 CMAFLP-18, CMAFLP-21, and CMAFLP-110 did not show profiles of bands in
227 the *Cynara cardunculus* and *Cynara humilis* species. These results are in
228 disagreement with those obtained by Acquadro and others (2005a) since in their
229 study with *Cynara cardunculus* L. these primers amplified between 10 to 5 bands
230 for this species.

231 The primers CMAFLP-11 and CMAFLP-15 did not show good results for the
232 amplification of DNA obtained from *Cynara cardunculus* or *Cynara humilis* (Table
233 3). These results also disagree with those obtained by Acquadro and others
10

234 (2005 b) who obtained 5 amplification products for *Cynara cardunculus* L. with
235 primer CMAFLP-11 (Acquadro and others 2005b) and 6 with primer CMAFLP-15
236 (Acquadro and others 2005a). In the case of the samples belonging to the
237 species *Onopordon nervosum*, amplification with these microsatellite primers
238 produced profiles of 8 to 9 total bands with molecular weights between 839 to 193
239 bp.

240 The results obtained using primer CMAFLP-08 showed that the band profiles of
241 the samples belonging to the species *Onopordon nervosum* consisted of 7
242 polymorphic bands ranging between 842 and 270 bp. In the case of *Cynara*
243 *cardunculus*, the profiles consisted of 3 polymorphic bands, while *Cynara humilis*
244 only included 2 polymorphic bands, although the *Cynara cardunculus* and *Cynara*
245 *humilis* profiles were very similar. The present results with the primer CMAFLP-08
246 for *Cynara cardunculus* were very similar to those obtained by Acquadro and
247 others (2005a).

248 Finally, the primer CMAFLP-24 amplified all the samples, resulting in different
249 band profiles for each species. There even appeared different bands between
250 samples belonging to the same species (Table 3, Figure 2). The bands ranged
251 from approximately 1120 to 140 bp, and a total of 11 polymorphic bands were
252 obtained. Similar results were obtained by Acquadro and others (2005b) with
253 *Cynara cardunculus*.

254 Therefore, the analysis of the specimenes collected was carried out with the
255 CMAFLP-24 primer.

256

257 *Analysis of collected thistle Asteraceae species by the RAPD-PCR and SSR*
258 *techniques*

11

259 After analyzing the results obtained with the RAPD and SSR techniques, it was
260 found that the best profiles with largest numbers of total and polymorphic bands
261 were obtained with OPAE10 and CMAFLP-24 primers, respectively. For this
262 reason, these primers were chosen for the characterization of the 106 collected
263 samples.

264 The RAPD-PCR comparing the DNA band profiles of the 106 isolates and the 5
265 reference species yielded three main clusters (Figure 3, Table 4) on application of
266 the UPGMA dendrogram analysis. These groups corresponded to the results
267 obtained from the morphological characterization: one containing the samples
268 belonging to the species *Onopordum nervosum* (cluster I), another *Cynara humilis*
269 (cluster II), and the third *Cynara cardunculus* (cluster III). The CQ1 and CQ5
270 samples that were characterized morphologically as *Sylibum marianum* and
271 *Cirsium arvense*, respectively, were not grouped in any of these clusters. They
272 were very close genetically with percentages of similarity of 85%, and close to
273 *Onopordum nervosum* (cluster I).

274 Cluster I grouped 9 of the collected samples with the *Onopordum nervosum* 07
275 reference species with percentages of similarity of 55%. In Cluster I, three
276 subgroups were distinguished by differences in the secondary bands (Table 4).
277 Samples from clusters I.2 and I.3 showed similar profiles with 6 common bands of
278 molecular weights of 887 to 208 bp, but in cluster I.2 there was no 540 bp band,
279 and in I.3 there appeared a band of 852 bp.

280 Cluster II grouped 17 samples with the *Cynara humilis* 08 reference, with
281 percentages of similarity of 40% (Figure 3, Table 4). All samples showed similar
282 profiles with 5 bands of molecular weights between 1184 to 314 bp, but
283 differences in the secondary bands which defined four subgroups. Samples in
12

284 cluster II.1 showed two additional amplification bands of 442 and 380 bp.
285 Samples grouped in cluster II.2 showed two secondary bands of 813 and 756 bp.
286 Cluster II.3 showed an identical profile of 6 amplification products of molecular
287 weights 1184 to 314 bp. And finally, cluster II.4 which was the most genetically
288 distant from the rest with percentages of similarity of 40% showed identical
289 profiles of three bands with molecular weights of 442, 380, and 314 bp.

290 Cluster III grouped 78 samples with the *Cynara cardunculus* references (CQ3-08,
291 CQ4-08, CQ5-08), with a 90% percent difference from the other two clusters.
292 Samples showed profiles of 7 common bands and several differences in the
293 secondary bands. Three subgroups with more than 60% similarities were found.
294 A greater genetic variation was thus present within this population. This is
295 consistent with the conclusions of Portis and others (2005a,b) and Sonnante and
296 others (2008).

297

298 Very similar trees were obtained from distance measurements calculated from
299 the SSR data (Figure 4). In this figure one observes three major clusters each
300 containing one of the species studied: *Onopordon nervosum* (cluster I), *Cynara*
301 *humilis* (cluster II), and *Cynara cardunculus* (cluster III). The CQ1 and CQ5
302 samples were not grouped into any of these clusters, and showed greater
303 percentages of similarity than with the RAPD technique.

304 The distribution of each of the samples in different subclusters with the SSR
305 technique was also due to differences in secondary bands of low intensity, and
306 was very similar to that obtained with the RAPD study (Table 5).

307

308 In conclusion, both techniques have allowed all the thistle species from
309 *Asteraceae* family samples collected to be characterized accurately and rapidly.
310 Both marker systems showed that the studied species possess a remarkable
311 number of differences. A greater degree of genetic differentiation was found
312 among the *Cynara cardunculus* populations because there were more RAPD and
313 SSR polymorphic bands found in this group.

314 It has been demonstrated therefore that these techniques can be used as an
315 effective tool for traceability by the authorities of the Protected Designation of
316 Origin in the production of the "Torta del Casar" cheese.

317

318 Acknowledgements

319 The authors are grateful to M. Cabrero and C. Cebrián for technical assistance,
320 and to PDO "Torta del Casar" for technical support.

321

322 References

323 Acquadro A, Portis E, Lanteri S. 2003. Isolation of microsatellite loci in artichoke
324 (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*). Mol. Ecol. Notes. 3:37–39.

325

326 Acquadro A, Portis E, Albertini E, Lanteri S. 2005a. M-AFLP-based protocol for
327 microsatellite loci isolation in *Cynara cardunculus* L. (Asteraceae). Mol.
328 Ecol. Notes. 5:272-274.

329

330 Acquadro A, Portis E, Lee D, Donini P, Lanteri S. 2005b. Development and
331 characterization of microsatellite markers in *Cynara cardunculus* L.
332 Genome. 48:217-225.

333

334 Barbosa M, Valles E, Vassal L, Mocquot G. 1976. L'utilisation d'extrait de *Cynara*
335 *cardunculus* L. comme agent coagulant en fabrication de fromages à
336 pâte molle et à pâte cuite. Lait. 56:1-7.

337

338 Cordeiro M, Jacob E, Puhan Z, Pais MS, Brodelius PE. 1992. Milk clotting and
339 proteolytic activities of purified cynarasas from *Cynara cardunculus* L. a
340 comparision to chymosin. Milchwissenschaft. 47:638-687.

341

342 Fernández-Salguero J, Sanjuán E, Montero E. 1991. A preliminary study of the
343 chemical composition of Guía cheese. J. Food Compos. Anal. 4:262-269.

344

345 Fernández-Salguero J, and Gómez R. 1997. Estudio de los quesos tradicionales
346 de Andalucía. Universidad de Córdoba Cajasur. Córdoba, Spain.

347

348 Hernández A, Aranda E, Martín A, Benito MJ, Bartolomé T, Córdoba MG. 2010.
349 Efficency of DNA typing methods for detection of smoked paprika
350 "Pimentón de la Vera" adulteration used in the elaboration of dry-cured
351 iberian pork sausages. J. Agr. Food Chem. 58:11688-11694.

352

353 Lanteri S, Di Leo I, Ledda L, Mameli MG, Portis E. 2001. RAPD variation within
354 and among populations of globe artichoke (*Cynara scolymus* L.), cv
355 'Spinoso sardo'. Plant Breeding. 120:243-247.

356

- 357 Lanteri S, Acquadro A, Quagliotti L, Portis E. 2003. RAPD and AFLP assessment
358 of genetic variation among and within populations of a landrace of pepper
359 (*Capsicum annuum* L.) grown in north-west Italy. Genet. Resour. Crop
360 Ev. 50:723–735.
- 361
- 362 Lanteri S, Saba E, Cadinu M, Mallica GM, Baghino L, Portis E. 2004. Amplified
363 fragment length polymorphism for genetic diversity assessment in globe
364 artichoke. Theor. Appl. Genet. 108:1534–1544.
- 365
- 366 Lanteri S, Acquadro A, Saba E, Portis E. 2004. Molecular fingerprinting and
367 evaluation of genetic distances among selected clones of globe artichoke
368 (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* L.) ‘Spinoso sardo’. J. Hortic. Sci.
369 Biotech. 79:863-870.
- 370
- 371 Macedo AC, Malcata FX, Oliveira JC. 1993. The technology, chemistry and
372 microbiology of Serra cheese: a review. J. Dairy Sci. 76:1725-1739.
- 373
- 374 Pagnotta MA, Carderelli MT, Rey Muñoz NA, Tucci M, Saccardo F. 2004.
375 Assessment of genetic variation in artichoke of ‘Romanesco’ type by
376 molecular markers. Acta Hortic. 660:99–104.
- 377
- 378 Pires E, Faro C, Macedo I, Esteves C, Morgado J, Veríssimo P, Pareira D,
379 Gómez D. 1994. Flor de cardo versus quimosina no fabrico de queijos
380 artesanais. Quimica alimentaria. 54:66-68.

381

16

- 382 Porebski S, Bailey LG, Baum BR, 1997. Modification of a CTBA DNA extraction
383 protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol
384 components. *Plant Mol. Biol. Rep.* 15:8-15.
- 385
- 386 Portis E, Acquadro A, Comino C, Lanteri S. 2004. Effect of farmers' seed
387 selection on genetic variation of a landrace population of pepper
388 (*Capsicum annuum* L.), grown in North-West Italy. *Genet. Resour. Crop*
389 *Ev.* 51:581-590.
- 390
- 391 Portis E, Acquadro A, Comino C, Mauromicale G, Saba E, Lanteri S. 2005a.
392 Genetic structure of island population of wild cardoon [*Cynara*
393 *cardunculus* L. var. *sylvestris* (Lamk) Fiori] detected by AFLPs and SSRs.
394 *Plant Sci.* 169:199-210.
- 395
- 396 Portis E, Mauromicale G, Barchi L, Mauro R, Lanteri S. 2005b. Population
397 structure and genetic variation in autochthonous globe artichoke
398 germplasm from Sicily Island. *Plant Sci.* 168:1591-1598.
- 399
- 400 Portis E, Barchi L, Acquadro A, Macua JI, Lanteri S. 2005c. Genetic diversity
401 assessment in cultivated cardoon by AFLP (Amplified Fragment Length
402 Polymorphism) and microsatellite markers. *Plant Breeding.* 124:299-304.
- 403
- 404 Raccucia SA, Mainolfi A, Mandolino G, Melilli G. 2004. Genetic diversity in
405 *Cynara cardunculus* revealed by AFLP markers: comparison between
406 cultivars and wild types from Sicily. *Plant Breeding.* 123:280-284.

407

408 Sonnante G, De Paolis A, Lattanzio V, Perrino P. 2002. Genetic variation in wild
409 and cultivated artichoke revealed by RAPD markers. *Genetic Resour.*
410 *Crop Ev.* 49:247-252.

411

412 Sonnante G, De Paolis A, Pignone D. 2004a. Relationships among artichoke
413 cultivars and some related wild taxa based on AFLP markers. *Plant*
414 *Genetic Resour.* 1:125–133.

415

416 Sonnante G, Ippedico M, De Paolis A. 2004b. Microsatellite and AFLP markers in
417 a world artichoke collection. *ISHS Acta Hortic.* 660:61–68.

418

419 Sonnante G, Carluccio AV, De Paolis A, Pignone D. 2008. Identification of
420 artichoke SSR markers: molecular variation and patterns of diversity in
421 genetically cohesive taxa and wild allies. *Genet. Resour. Crop Ev.*
422 55:1029–1046.

423

424 Trionfetti Nisini P, Crinò P, Pagnotta MA, Tavazza R, Ancora G. 2007. Recovery
425 and characterization of Italian artichoke traditional landraces of
426 ‘Romanesco’ type. *ISHS Acta Hortic.* 730:101–106.

427

428 Valdés B, Talavera S, Fernández-Galiano E. 1987. *Flora Vascular de Andalucía*
429 *Occidental.* Ketres Editora, S.A. Barcelona. España.

430

431 Vieira de Sá F, Barbosa M. 1972. Cheese-making with vegetable rennet from
432 cardo (*Cynara cardunculus*). J. Dairy Res.39:335-343.

433

434 Vioque M, Gómez R, Sánchez E, Mata C, Tejada L, Fernández-Salguero J. 2000.
435 Chemical and Microbiological Characteristics of Ewes' Milk Cheese
436 Manufactured with Extracts from Flowers of *Cynara cardunculus* and
437 *Cynara humilis* as Coagulants. J. Agric. Food Chem. 48:451-456.

438

439

For Peer Review

440 Figure 1. RAPD amplification patterns generated by the primer OPAE 10. Lane 1,
441 *Onopordum nervosum* 07 standard; lane 2, CQ18 sample; lane 3, *Cynara*
442 *cardunculus* CQ3-08 standard; lane 4, CQ38 sample; lane 5, *Cynara humilis* 08
443 standard; lane 6, CQ12 sample; lane M DNA molecular size marker VI of 2.1-0.15
444 kbp (Roche Farma, IN, USA).

445

446 Figure 2. SSR amplification patterns generated by the primer CMAFLP 24. Lane
447 1, *Onopordum nervosum* 07 standard; lane 2, CQ18 sample; lane 3, *Cynara*
448 *cardunculus* CQ3-08 standard; lane 4, CQ38 sample; lane 5, *Cynara humilis* 08
449 standard; lane 6, CQ12 sample; lane M DNA molecular size marker VI of 2.1-0.15
450 kbp (Roche Farma, IN, USA).

451

452 Figure 3. Dendrogram obtained using RAPD amplification patterns generated by
453 the primer OPAE 10 from cardoon species used as standards and collected in the
454 field.

455

456 Figure 4. Dendrogram obtained using SSR amplification patterns generated by
457 the primer CMAFLP 24 from cardoon species used as standards and collected in
458 the field.

459

460 Table 1. Specimens collected and their morphological identification.

No. of samples	Morphological identification	Samples
1	<i>Sylibum marianum</i>	CQ1
1	<i>Cirsium arvense</i>	CQ5
9	<i>Onopordon nervosum</i>	CQ8 - CQ9 - CQ10 - CQ17 - CQ18 - CQ19 - CQ29-CQ68-CQ69
17	<i>Cynara humilis</i>	CQ4 - CQ6 - CQ11 - CQ12 - CQ13 - CQ14 - CQ15 - CQ16 - CQ23 - CQ24 - CQ25 - CQ62 - CQ63 - CQ64 - CQ65 - CQ66 - CQ71
78	<i>Cynara cardunculus</i>	CQ20 - CQ21 - CQ22 - CQ26 - CQ27 - CQ28 - CQ30 - CQ31 - CQ32 - CQ33 - CQ34 - CQ36 - CQ37 - CQ38 - CQ39 - CQ40 - CQ41 - CQ42 - CQ43 - CQ45 - CQ46 - CQ47 - CQ48 - CQ49 - CQ50 - CQ51 - CQ52 - CQ53 - CQ54 - CQ55 - CQ56 - CQ57 - CQ58 - CQ59 - CQ60 - CQ61 - CQ67 - CQ75 - CQ78 - CQ80 - CQ82 - CQ83 - CQ84 - CQ85 - CQ86 - CQ87 - CQ88 - CQ89 - CQ103 - CQ104 - CQ108 - CQ109 - CQ110 - CQ111 - CQ112 - CQ113 - CQ114 - CQ115 - CQ116 - CQ117 - CQ118 - CQ119 - CQ120 - CQ121 - CQ122 - CQ123 - CQ124 - CQ125 - CQ126 - CQ127 - CQ128 - CQ129 - CQ130 - CQ131 - CQ132 - CQ133 - CQ134 - CQ135

461

462

Table 2. Primers, range of molecular weight, total and polymorphic bands, and species differentiation bands (characterized by molecular weight in bp) amplified with RAPD primers.

Primers	Primer sequence (5'-3')	Range of mol. wt. (bp) bands	Total bands	Polymorphic bands	<i>Onopordon nervosum</i>	<i>Cynara cardunculus</i>	<i>Cynara humilis</i>
OPB06	TGCTCTGCC	912 to 280	10	9	728, 631, 557, 438, 348	806, 590, 280	806, 590, 377, 280
OPB07	ACGCGCCCT	1190 to 168	10	9	1090, 869, 829, 760, 435, 300	---	1190, 984, 760, 691, 435, 300
OPE19	ACGGCGTATG	1355 to 257	13	12	939, 580, 446	1355, 811, 648	1166, 939, 874, 811, 718, 648, 580, 535, 470, 446, 257
OPF05	CCGAATTCCC	1406 to 250	13	12	1111, 886, 647, 512, 345	965, 886, 767, 710	767, 710, 647, 569, 453, 407, 250
OPF08	GGGATATCGG	1244 to 392	12	11	1060, 846, 687, 617, 439, 392	955, 795, 581	1244, 1060, 955, 917, 846, 687
OPG12	CTCCCAGGGT	1114 to 445	4	4	1114, 1033, 472, 445	---	---
OPAE10	CTGAAGCGCA	1193 to 208	17	14	887, 689, 579, 509, 450, 345, 305, 249, 208	1072, 926, 854, 689, 509, 305	1193, 753, 450, 345
TOTAL		1406 to 168	79	71	38	19	38

Table 3. Primers, range of molecular weight, total and polymorphic bands, and species differentiation bands (characterized by molecular weight in bp) amplified with SSR primers.

Primers	Primer sequence (5'-3')	Range of mol. wt. (bp) bands	Total bands	Polymorphic bands	<i>Onopordon nervosum</i>	<i>Cynara cardunculus</i>	<i>Cynara humilis</i>
CMAFLP-04	CGATAGCTCTTTCCCTTT ATGGGTGAGATTGGTTTAC	614 to 197	5	5	614, 478, 355, 285, 197	---	---
CMAFLP-07	GGCTCCACCGTACTCCTA TCTCTCGTCAGTAAACCC	839 to 387	4	4	839, 622, 489, 387	---	---
CMAFLP-08	AGGTGTGAAGGCTTCATC TCCCAGATCCTTGACTCAG	842 to 248	10	9	842, 703, 600, 474, 352, 314, 270	539, 430, 314	539, 430
CMAFLP-11	GAAGGAGAAGCTTGATATCTG CATCCTCACGAGGACATC	744 to 278	10	9	744, 517, 383, 330, 306, 278	581, 420, 281	581, 420, 281
CMAFLP-13	TTTGATCTTGTCCCTATATATATA TCGGCTTTTCTGAATATC	436 to 314	2	2	---	436, 314	---
CMAFLP-15	TTGAGAGGGTTTTCCGAGAG TAGGATGAGTCCTGAGTAAT	839 to 193	9	7	740, 548, 433, 268, 236, 193	839, 433	548
CMAFLP-18	AAGTGTGCATAATAACTTACC CCGAACAAATTGCTTACAA	1523 to 388	10	9	1523, 1365, 1127, 915, 849, 730, 501, 466, 388	---	915, 730, 501
CMAFLP-21	TAAATAGTTAGTGTCTCGTTTTG TGGGGTTGTATTGGTTG	513 to 228	6	4	513, 282, 228	357	---
CMAFLP-24	GCCCGTTCACACACAACA CAGGTTCTTTTATACAGCAG	1120 to 140	13	11	1120, 835, 731, 520, 402, 369	520, 369, 192	955, 835, 731, 605, 319, 192, 140
CMAFLP-110	AGTGGGTAAGTGGGGATG ATCTCCACATTTTCTCCTCC	628 to 235	4	2	628, 313	313	---
TOTAL		1523 to 140	73	62	48	15	16

1 Table 4. Samples collected grouped into clusters by RAPD with OPAE 10 primer.

Clusters by RAPD	Subcluster (no. of samples)	Samples	Identification
			RAPD
Cluster I (9)	I.1 (4)	CQ8, CQ9, CQ10, CQ68	<i>Onopordon nervosum</i>
	I.2 (4)	CQ17, CQ18, CQ19, CQ69	<i>Onopordon nervosum</i>
	I.3 (1)	CQ29	<i>Onopordon nervosum</i>
Cluster II (17)	II.1 (5)	CQ4, CQ6, CQ11, CQ62, CQ63	<i>Cynara humilis</i>
	II.2 (5)	CQ12, CQ13, CQ14, CQ64, CQ66	<i>Cynara humilis</i>
	II.3 (5)	CQ23, CQ24, CQ25, CQ65, CQ71	<i>Cynara humilis</i>
	II.4 (2)	CQ15, CQ16	<i>Cynara humilis</i>
Cluster III (78)	III.1 (44)	CQ20, CQ21, CQ22, CQ26, CQ27, CQ28, CQ34, CQ37, CQ38, CQ39, CQ47, CQ48, CQ49, CQ50, CQ53, CQ56, CQ103, CQ104, CQ108, CQ109, CQ110, CQ111, CQ112, CQ113, CQ114, CQ115, CQ117, CQ118, CQ119, CQ120, CQ121, CQ122, CQ123, CQ125, CQ126, CQ127, CQ128, CQ129, CQ130, CQ131, CQ132, CQ133, CQ134, CQ135	<i>Cynara cardunculus</i>
	III.2 (21)	CQ33, CQ51, CQ52, CQ54, CQ55, CQ40, CQ41, CQ42, CQ43, CQ57, CQ59, CQ60, CQ61, CQ67, CQ78, CQ80, CQ82, CQ83, CQ85, CQ87, CQ89	<i>Cynara cardunculus</i>
	III.3 (13)	CQ30, CQ31, CQ32, CQ36, CQ45, CQ46, CQ58, CQ75, CQ84, CQ86, CQ88, CQ116, CQ124	<i>Cynara cardunculus</i>

2

3

4 Table 5. Samples collected grouped into clusters by SSR with CMAFLP-24
5 primer.

Clusters by SSRs	Subcluster (no. of samples)	Samples	Identification
			SSRs
Cluster I (9)	I.1 (4)	CQ8, CQ9, CQ10, CQ68	<i>Onopordon nervosum</i>
	I.2 (4)	CQ17, CQ18, CQ19, CQ69	<i>Onopordon nervosum</i>
	I.3 (1)	CQ29	<i>Onopordon nervosum</i>
Cluster II (17)	II.1 (6)	CQ4, CQ6, CQ15, CQ16, CQ62, CQ63	<i>Cynara humilis</i>
	II.2 (6)	CQ11, CQ23, CQ24, CQ25, CQ65, CQ71	<i>Cynara humilis</i>
	II.3 (5)	CQ12, CQ13, CQ14, CQ64, CQ66	<i>Cynara humilis</i>
Cluster III (67)	III.1 (14)	CQ20, CQ21, CQ22, CQ26, CQ27, CQ28, CQ57, CQ109, CQ110, CQ111, CQ113, CQ119, CQ121, CQ134	<i>Cynara cardunculus</i>
	III.2 (44)	CQ33, CQ34, CQ37, CQ38, CQ39, CQ40, CQ41, CQ42, CQ43, CQ47, CQ48, CQ49, CQ50, CQ51, CQ52, CQ53, CQ54, CQ55, CQ56, CQ88, CQ89, CQ103, CQ104, CQ108, CQ112, CQ114, CQ116, CQ115, CQ117, CQ118, CQ120, CQ122, CQ123, CQ124, CQ125, CQ126, CQ127, CQ128, CQ129, CQ130, CQ131, CQ132, CQ133, CQ135	<i>Cynara cardunculus</i>
	III.3 (20)	CQ30, CQ31, CQ32, CQ36, CQ45, CQ46, CQ58, CQ59, CQ60, CQ61, CQ67, CQ75, CQ78, CQ80, CQ82, CQ83, CQ84, CQ85, CQ86, CQ87	<i>Cynara cardunculus</i>

6

7

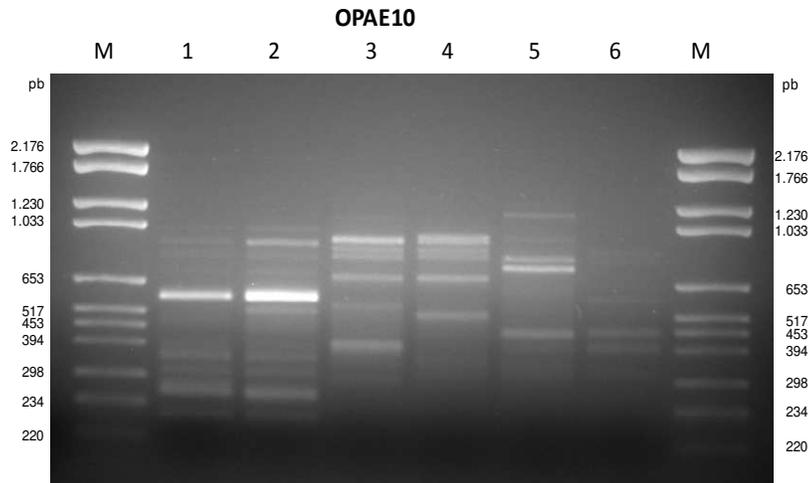


FIGURE 1

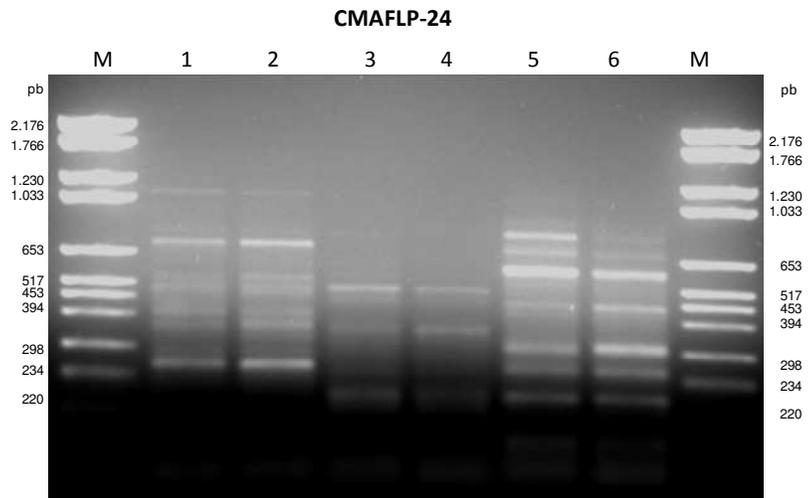


FIGURE 2

For Peer Review

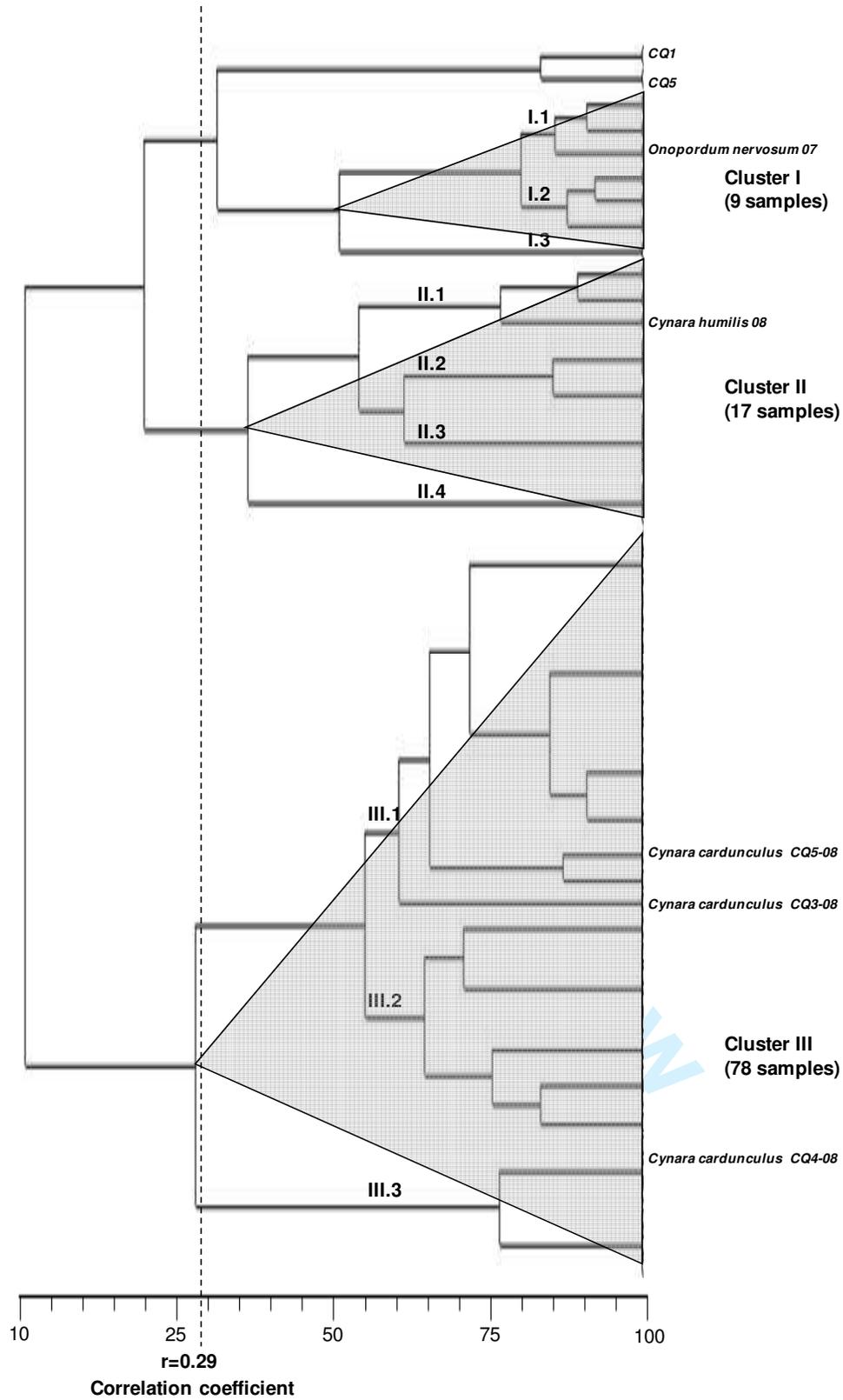


FIGURE 3

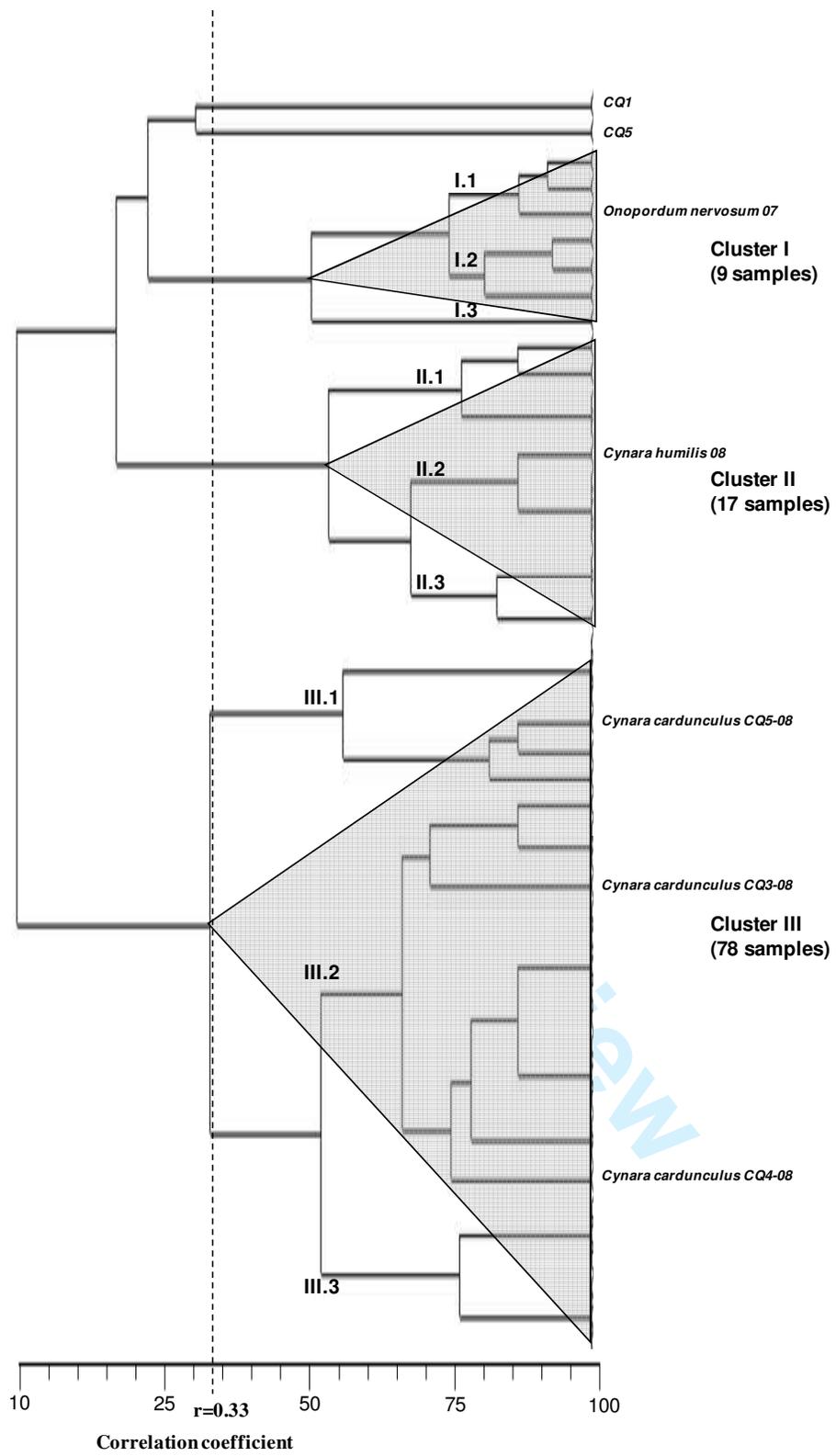


FIGURE 4

IV.1.2. Characterisation by protein profiles methods for detection of the vegetable rennet (*Cynara cardunculus*) adulteration used in “Torta del Casar” cheese-making.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20

Characterisation by Proteins Profiles Methods for Detection of the vegetable rennet (*Cynara cardunculus*) Adulteration used in “Torta del Casar” cheese-making

Ordiales, E.²; Martín, A.¹; Benito, M.J.¹; Ruiz –Moyano, S.¹, Aranda, E.¹, Córdoba, M. G.^{1*}

¹*Nutrición y Bromatología. Escuela de Ingenierías Agrarias, University of Extremadura, Ctra. de Cáceres s/n, 06071 Badajoz, Spain.*

²*Agricultura, Centro Tecnológico Nacional Agroalimentario Extremadura, CTAEX. Ctra. Villafranco a Balboa, km 1.2. 06195 Villafranco del Guadiana, Badajoz, Spain.*

*Author for correspondence. Tel.: +34 924286200; fax: +34 924286201.
E-mail address: mdeguia@unex.es (M. G. Córdoba)
<http://eia.unex.es/>

21 **ABSTRACT**

22 The purpose of this work was to develop a procedure based on protein analysis by Sodium
23 Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) that can be used in the
24 determination of *Cynara cardunculus* dried flowers adulteration with other thistle species from
25 Asteraceae family, which dried flowers could be confused with, giving laid to a fraud in the
26 Torta del Casar cheese-making. Samples of flowers of different thistle's species were collected
27 in Extremadura, in the southwest of Spain. Both methods, SDS-PAGE and FZCE (free zone
28 capillary electrophoresis) showed a high efficiency to discriminate *Cynara cardunculus* from
29 other thistle species properly. In addition, 172 samples of cardoon flowers (*Cynara*
30 *cardunculus*) grouped according to location, harvest year, and ripening stages were used in the
31 study. The SDS-PAGE method showed higher effectiveness in discriminating the technological
32 properties, milk-clotting and casein degradation activities, of vegetal rennets used in this study.
33 The SDS-PAGE technique allowed group aqueous extracts from flowers of *C. cardunculus* in
34 five different groups, which exhibited different ability to degrade the milk caseins.

35

36

37

38

39 Keywords: *Cynara cardunculus*, SDS-PAGE, protein profile, proteolytic activity, milk clotting
40 activity.

41

42

43

44 1. Introduction

45 “Torta del Casar” is a traditional cheese of Extremadura region, in the south-west of
46 Spain. It is made from raw ewe’s milk “Merino” and “Entrefina” in Cáceres province. It was
47 labeled with PDO (Protected Denomination of Origin) in accordance with the Regulations (CE)
48 1491/2003 of the European Commission. This cheese is characterized by a soft and spreadable
49 texture, a slightly bitter taste and strong aroma, due to the vegetable rennet used as coagulant,
50 an aqueous extract of *Cynara cardunculus* L. dried flowers. No starter culture is added and the
51 minimum time for ripening is 60 days. It is a well-known cheese with an increasing production
52 every year, since it is much appreciated by consumers for its high quality and unique flavor
53 (Delgado et al., 2010).

54 The extracts of the flowers of others *Cynara* species, *C. humilis* and *C. scolymus*, have
55 also been claimed to be effective as rennet (Silva and Malcata, 2000; Veríssimo et al., 1996).
56 Extracts from *C. humilis* were also used in the manufacture of ewe’s milk cheeses in Portugal
57 (Serra and Sherpa) and Spain (Los Pedroches, La Serena and Torta del Casar), especially when
58 *C. cardunculus* is scarce (Fernández –Salguero et al., 1999; Vioque et al., 2000). Also, milk
59 clotting activity was also found in flowers of *Centaurea calcitrapa*, *Onopordum turcicum* and
60 *Sylibum marianum* (Domingos et al., 1998; Tamer, 1993; Vairo Cavalli et al., 2005). All these
61 species belong to the Asteraceae family, and furthermore lie in the same tribe: Cardueae Cass.
62 = Cynarae Less. (Ariza – Espinar et al., 1998).

63 The milk clotting activity of these species is due to their content in aspartic proteinases,
64 named cardosins or cynarases (Heimgartner et al., 1990; Brodelius et al., 1995; Cordeiro et al.,
65 1998; White et al., 1999; Silva et al., 1999). These enzymes are similar, in terms of specificity
66 and activity, to chymosin and pepsin (Pires et al., 1994; Veríssimo et al., 1995), although the
67 proteolytic activity of cynarases appears to be less specific than of chymosin. This aspect is
68 suited to the manufacture of soft-bodied cheeses often associated with bitter tastes and relatively
69 low yields, such as “Torta del Casar” (Tavaria et al., 2001). The use of flowers with different

70 protease content due to the natural variability and seasonal climatic variations is responsible for
71 variations in the morpho-organoleptic characteristics of the cheese (Heimgartner et al., 1990).
72 Moreover the dried flowers of the thistle species studied can be confused with dried flowers of
73 *C. cardunculus*, which contributes to the lack of homogeneity in cheese making process, and it
74 involves a fraud in “Torta del Casar” cheeses labeled with PDO. In order to get high
75 homogeneity between cheese batches, enhance the cheese yield and its sensorial quality, it is
76 desirable to know the *Cynara cardunculus* plants collected in Extremadura. Thus, the
77 development of a method for the quality control of the aqueous extracts used as rennet would be
78 desirable for standardisation of the cheese-making process.

79 A protein profile study is suitable for such a purpose. Various works have described
80 methods based on protein patterns to control food quality (Barnwell et al., 1994; Toorop et al.,
81 1997; Skarpied et al., 2001; Bietz, 1994; Cancalon, 1995). Analyses of proteins in these
82 complex mixtures are presently performed mainly by SDS-PAGE methods. Sodium dodecyl
83 sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) whole-cell protein pattern analysis
84 offers the advantages of being fairly fast and easy and, when performed under highly
85 standardized conditions, of having a good level of taxonomic resolution at species or subspecies
86 level. SDS-PAGE protein profile analysis has been used successfully to identify LAB isolated
87 from wines and musts (Patarata et al., 1994), Italian ewe’s-milk cheeses (De Angelis et al.,
88 2001), and eggplants (Sánchez et al., 2003), to identify paprika varieties (Hernández et al.,
89 2006), to visualize cynaras purified from *Cynara scolymus* and to monitor the hydrolysis of
90 caseins by the extracts from *C. scolymus* (Chazarra et al., 2007), from sunflower and albizia
91 seeds (Egito et al., 2007). SDS-PAGE methods has been defined as an efficient taxonomic tool
92 for rapid differentiation of the most common lactic acid species (Benito et al., 2008a) and
93 *Staphylococcus* species (Benito et al., 2008b) in dry fermented meat products. Capillary
94 electrophoresis (CE) may be used as an alternative method to SDS-PAGE, (Cancalon, 1995;
95 Manabe, 1999; Ordiales et al., 2012). CE methods involve a simple extraction of proteins and
96 small quantities of organic solvents in comparison with RP-HPLC. A subset of CE called free

97 zone capillary electrophoresis (FZCE) has been applied to the analysis of complex protein
98 systems. Numerous papers have reported the potential of FZCE to discriminate, or fingerprint,
99 foodstuffs such as cereals, paprika, cherries (Hernandez et al., 2007; Serradilla et al., 2008). In
100 last decade, CE has proved to be an efficient separation technique for the analysis of food
101 proteins in general (Frazier et al., 1999, 2000; Recio et al., 2001) and milk proteins in particular
102 (Recio et al., 1997). In fact, CE has been applied to monitoring proteolysis in cheese (Molina et
103 al., 1998; Otte et al., 1999), mainly in bovine cheese, but also in ewe and goat cheeses (Cattaneo
104 et al., 1996; Irogoyen et al., 1996; Molina et al., 2000; Ordiales et al., 2012). Moreover this
105 technique has been used to study the proteolysis of cheese produced with *Cynara L.* as
106 coagulant (Roseiro et al., 2003). Thus, both techniques FZCE and SDS-PAGE could be used for
107 the quality control of the extract used as rennet in “Torta del Casar” manufacture.

108 The aim of this work was to develop a procedure based on protein profile analysis that
109 can be used to control the technological quality of aqueous extracts used as rennet in “Torta del
110 Casar” manufacture.

111

112 **2. Materials and Methods**

113 *2.1. Plant material*

114 Several thistle species belonging to Asteraceae family were sampled. Leaves and flowers were
115 collected from different plants grown in field, in several parts of Extremadura region.
116 Morphological characterization was carried out in situ, in accordance with the guidelines of
117 Valdés et al. (1987) (Table 1). Flowers were collected individually from each thistle plant in
118 order to analyze the variability among plants within the same species. A total of 65 samples
119 were collected in 2006, from *C. cardunculus, L.*, *C. humilis, L.*, *C. scolymus, L.*, *Silybum*
120 *marianum (L) Goernt.*, and *Onopordum nervosum, Boiss.* species and 140 samples of *C.*
121 *cardunculus* during the seasons of the years 2007, 2008 and 2009 in the most representative
122 areas of Extremadura region (Table 2). They were grouped into 3 different ripening stages in

123 accordance with the cardoon flower's phenological characteristics, ripening stage a (flowers
124 opening, only some styles, and stigmas are visible), b (flowers fully open, even with pollen) and
125 c (flowers begin to dry, so they are brownish, instead of violet colour). The collected samples
126 were transported to the laboratory to be dried and analyzed and there the flowers were separated
127 from the rest of the involucre. They kept at room temperature until they were dried and then
128 conserved in a cool dry place up to their utilization and analysis.

129

130 2.2. Extraction of coagulant extracts of proteins for SDS-PAGE and CE analysis

131 For the SDS-PAGE analysis an aqueous crude extract from dried flowers of different
132 Asteraceae species was prepared with 1 g of dried flowers in 5 mL of water and kept for 4 h at
133 room temperature. The homogenate was filtered through a Whatman filter No. 4.

134 Direct extraction of dried flowers from Asteraceae species with water may lead to components
135 other than proteins being removed and, consequently, poor resolution of FZCE. In fact, these
136 extracts may also contain compounds such as polysaccharides, polyphenols, anthocyanin,
137 tannins, DNA, free amino acids, and sugars that can potentially bind the inner walls of the silica
138 capillaries (Bean and Lookhart, 2001). Hence, a pre-extraction step was included, mixing 1 g of
139 the dried flower with methanol (3:10 w/v) for 5 min at room temperature, according Hernández
140 et al. (2006) method. Longer extraction time did not improve the effectiveness of the extraction.
141 The suspension vortexed periodically, centrifuged at 5800 g for 5 min and the supernatant was
142 collected. From an aliquot of 0.5 mL, methanol-soluble proteins were partially precipitated
143 (except for the most of the apolar protein fraction) with chloroform (1:2 v/v) and centrifuged at
144 24000 g for 5 min. The pellets were cleansed twice with chloroform, and then suspended in 100
145 μL of 30% (v/v) acetonitrile according to the protocol described by Hernandez et al. (2006).

146 Cardosins standars have been purified from *C. cardunculus* flowers according to Sidrach et al.
147 (2005) with some modification. Stigmas (100 g) were ground in a food mixer and
148 homogeneized in 800 mL 50 mM aqueous citrate buffer (pH 3.0), containing 1 M NaCl to

149 prevent non-specific proteinase binding to the filter membrane in the following ultrafiltration
150 step. The ground homogenate was filtered through muslin to remove most of the solid residue.
151 After centrifugation of the homogenate at 24000 rpm for 20 min, the supernant was filtered
152 through a Whatman 4 filter paper. The resulting solution constituted the crude extract, which
153 was concentrated and dialyzed by ultrafiltration (Pellicon XL PXB010A50, Millipore) against
154 25 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6 coupled to FPLC system equipped with a UV detector at 214
155 nm and a fraction collector FRAC-950 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden).
156 After sample application, the enzymes were displaced with step gradients of 0.30, 0.35 and 0.5
157 M NaCl in the previous buffer. The fractions that contain the cardosins were collected. Before
158 FCZE analysis, cardosin fractions were concentrated and dialyzed by ultrafiltration (Pellicon-2
159 PLCGC10, Millipore Corp.) against ultrapure water.

160

161 *2.2.1. SDS-PAGE analysis of coagulant extracts proteins*

162 The proteins for SDS-PAGE, extracted as described above, were mixed with 30 μ L of PAGE
163 loading buffer (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 20% (w/v) glycerol, 2% (w/v) SDS, 5% (w/v) β -
164 mercaptoethanol, 0.025% (w/v) bromophenol blue) and incubated at 99° C for 5 min for protein
165 denaturing. The electrophoresis conditions were those described by Laemmli (1970), and the
166 concentrations for acrylamide (29:1 acrylamide/bisacrylamide) in the gels were 4% (w/v) for
167 staking gels, and 15% (w/v) for separating gels. Gels were cast and run in a Miniprotean III
168 device (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). The molecular mass marker kits (Sigma
169 Chemical Co., St. Louis, MO) contain proteins from 6.5 to 205 kDa. The gels were
170 subsequently stained with 0.5% (w/v) Coomassie blue (G-250) dissolved in 45% (v/v) water,
171 45% (v/v) methanol, and 10% (v/v) glacial acetic acid for 30 min and destained with a solution
172 consisting of 20% (v/v) methanol, 10% (v/v) glacial acetic acid, and 70% (v/v) distilled water
173 for 4 h. A computer image analysis program (Genetools, Synoptics Ltd., Cambridge, U.K.) was
174 used for the densitometric analysis of the gel electrophoresis.

175

176 *2.2.2. FZCE analysis of coagulant extracts proteins*

177 The protein extracts were previously filtrated through a 0.2 µm filter and analyzed by FZCE.
178 The separations were done on an automated PACE 5500 device (Beckman Instruments, INC.,
179 Palo Alto, CA). To minimise the interaction of proteins with the column wall, basic pH values
180 were chosen to make the run buffer. Run buffer was prepared with HPLC-grade water obtained
181 from a Mili-Q water purification system, and consisted of 8.75 mM phosphate 20.6 mM
182 tetraborate at a nominal pH of 9. This buffer has been successfully used for the determination of
183 vegetable proteins by FZCE (Flurer et al., 2000; Hernández et al., 2006, 2007). Uncoated fused
184 silica capillaries of 75 µm i.d. and 57 cm total length (50 cm to window detector) were used
185 (Supelco, Technocroma, Barcelona, Spain). The capillaries were initially conditioned with 100
186 mM NaOH for 10 min, and then with de-ionized water for 5 min. They were rinsed between
187 separations for 2 min with 100 mM NaOH, for 2 min with de-ionized water, and then with
188 separation buffer for 2 min. When not in use, the capillaries were rinsed with 100 mM NaOH
189 for 10 min, followed by water for 10 min, and finally dried by nitrogen gas for 10 min. The
190 separation voltage was 263 V/cm (15 kV) and the separation temperature was 23° C. The
191 wavelength used to monitor the assays was 254 nm. Samples were injected under pressure (0.5
192 psi) for 5 s and the protein spectra were monitored from 190 to 300 nm with a PACE diode
193 array detector (Beckman Instrument Inc., Palo Alto, CA, USA). Protein peaks were identified
194 using correct migration times and UV absorbance spectra. The Beckman P/ACE Station
195 (Version 1.21) software package was used to store, manipulate and compare the
196 electroferograms.

197

198 *2.3. "In vitro" casein proteolytic activity*

199 The dried flowers extracts were prepared by macerating 0.25 g of dried flowers in 5 mL of
200 water (corresponding to a proportion of 50 g in 1 L), at room temperature for 4 h. The

201 homogenate was filtered through a Whatman filter No. 4. The substrate used for degradation by
202 extracts consisted of a mix of bovine caseins (Sigma Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) (α , β ,
203 γ k), at a concentration of 0.5 mg/mL of each casein, dissolved in 5 mL of distilled water. The
204 dried flowers extracts were macerated with the casein mix, at 2.5% of extract (v/v), for 2 h at
205 room temperature, to allow the casein degradation. After this time the extracts with degraded
206 caseins were denatured by adding 30 μ L of PAGE loading buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8,
207 20% (w/v) glycerol, 2% (w/v) SDS, 5% (w/v) β -mercaptoethanol, 0.025% (w/v) bromophenol
208 blue) and incubated at 99° C for 5 min. The electrophoresis conditions and the analysis method
209 used were described above.

210

211 2.4. Milk clotting activity assay

212 This assay was performed only for *C. cardunculus* samples. For milk-clotting assays, 0.5 g of
213 each cardoon sample was softened in 75 mL of ultrapure water for 1 and 24 h. The rennet
214 clotting time of these coagulant extracts was measured according to a standard method
215 (NILAC™; NIZO, Ede, The Netherlands) described by Tavaría et al. (2001). The substrate was
216 prepared by dissolving 12 g of low-heat bovine skimmed milk powder in 100 mL of 0.01 M
217 CaCl₂ (pH 6.5) at 30 °C. The enzymatic assay was performed using 0.2 mL of coagulant extract
218 added to 2 mL of reconstituted skim milk, and the clotting time was determined by visual
219 inspection. One rennet unit (R.U.) was defined as the amount of crude enzyme extract needed to
220 coagulate 10 mL of reconstituted low-heat processed skim milk at 30 °C in 100 s (FIL-IDF
221 157/1992). Determinations were quadruplicated, and the mean of each set of four data was taken
222 as the datum point.

223 2.5. Antimicrobial activity

224 The culture collection strains used as standards to develop this method were: *Listeria*
225 *monocytogenes* CECT 934, *Listeria monocytogenes* CECT 911, *Escherichia coli* CECT 4267,

226 *Staphylococcus aureus* CECT 976, *Bacillus cereus* CECT 131, *Yersinia enterocolitica* CECT
227 559, *Lactobacillus plantarum* CECT 223, *Lactobacillus brevis* CECT 216, *Lactobacillus sakei*
228 *ssp. carnosus* CECT 5766, *Lactobacillus curvatus* CECT 904, *Leuconostoc mesenteroides ssp.*
229 *Mesenteroides* CECT 394, *Pediococcus pentosaceus* CECT 923. Strain *Salmonella enteritidis*
230 (1263) from Centro Tecnológico Nacional Agroalimentario Extremadura (CTAEX) were also
231 used as standard. The strains were grown in broth (BHI for non-lactic bacteria and MRS for
232 lactic bacteria) for 48 h at 30 or 37° C according to the strain. The *C. cardunculus* flower
233 extracts were prepared by macerating 50 g of dried flowers in 1 L of water for 24 h at room
234 temperature, adjusted to 6.5 pH, using NaOH as neutralizer, and then were filter-sterilized (0.22
235 µm). The ability of *C. cardunculus* flower extracts to avoid the growth of pathogenic bacteria
236 and lactic acid bacteria was evaluated by following the microbial growth at 37° C for 1 day with
237 an automated turbidometer Bioscreen C. Analysing System (Labsystems, Finland). The optical
238 density was measured with a wide band filter (OD 420-580 nm). Inocula of 5% in a total
239 volume of 210 µL. MRS and BHI broth without supplements, and adjusted to 6.5 pH, were used
240 as control media. The inhibition of the flower extracts was determined by comparing the growth
241 rates with those obtained with controls. Optical densities below 200, 400 and 600 arbitrary
242 absorbance units (AAU) respect to control were considered as low, moderate and high
243 antimicrobial activities, respectively.

244

245 2.6. Statistical analysis

246 Statistical analysis of the data was carried out using SPSS for Windows, 15.0. (SPSS Inc.,
247 Chicago, Illinois, USA). Mean values of the technological and analytical parameters (FZCE
248 peaks or SDS–PAGE bands) were studied by one-way analysis of variance (ANOVA) and
249 separated by Tukey's honest significant differences test ($P < 0.05$). The relationships between
250 the technological parameters and FZCE peak area or SDS–PAGE band intensity values were
251 evaluated by Pearson correlation coefficients. A principal component analysis (PCA) was

252 performed on the analytical parameters to study the relationships between the protein profiles of
253 the vegetable rennet and the proteolytic activity against caseins.

254

255 **3. Results and Discussion**

256 3.1. *SDS-PAGE protein profile of different thistle Asteraceae species*

257 Table 3 shows the polypeptide bands profiles obtained for each thistle species belonging to
258 Asteraceae family. Protein profile determined by SDS-PAGE analysis showed a total of 15
259 polypeptide bands with an approximate molecular mass range of 13–67 kDa. As seen in Table
260 3, quantitative differences were detected by comparing the densitograms of the thistle species.
261 *Cynara cardunculus* protein profile presents 9 bands. The bands more intense, 16.7 and 28.3
262 kDa, and 13.5 and 30.2 kDa, corresponded to cardosin A and cardosin B, respectively. The rest
263 of the bands of this species belong to procardosin A (45 and 55 kDa) and procardosin B (60.2
264 kDa), as was described by Ramalho Santos et al. (1997). The mature form of cardosin A (31
265 kDa) was detected, in callus tissue cells along with a band of 45 kDa and one of 55 kDa. The
266 band of 45 kDa is frequently observed and has been described as corresponding to non-
267 dissociated chains of the enzyme (Ramalho Santos et al., 1998). Regarding cardosin B it was
268 detected the 64 kDa band (60.2 kDa in our survey), corresponding to the precursor and the 55
269 kDa band, similar to what was observed for cardosina A. Also, these authors have reported that
270 the band of 55 kDa may correspond to an intermediate form of cardosins without the
271 prosegment, hypothesis supported by the already documented cleavage sites for cardosin A,
272 Arg68-Asp69, Asn309-Gly310 and Ser414-Thr415, although the 55 kDa band was not detected
273 in thistle flowers (Ramalho – Santos, et al., 1997; Vieira, et al., 2001), but in the seeds or leaves
274 (Pereira, et al., 2008).

275 The specie *Cynara scolymus* shows a protein profile composed of 10 polypeptide bands with an
276 approximate molecular mass range 13.5 to 60.2 kDa. Bands corresponding to cardosin A and
277 cardosin B show the same intensity than *C. cardunculus*, while the 60.2 kDa band was

278 significantly less intense than that of *C. cardunculus* (Sidrach et al., 2005). On the other hand,
279 *Cynara humilis* protein profile is defined by 6 polypeptide bands corresponding to the
280 characteristic bands of cardosin A (16.7 and 28.3 kDa), and other less intense bands (55, 60.2
281 and 66.2 kDa), which would correspond to procarnosin forms (Ramalho Santos et al., 1998).
282 However, the species *C. humilis* no polypeptide bands corresponding to the enzyme cardosina B
283 (Esteves et al., 1995). Carnosins A and B represent the best characterized floral Aspartic
284 Proteases, together with cyprosins (Brodellius et al., 98; Cordeiro et al., 94). Regarding the
285 specie *Silybum marianum*, this profile shows 3 proteins SDS-PAGE bands, two of them, of
286 approximately 35 and 64 kDa, were not present in the rest of the studied species and *Onopordum*
287 *nervosum* showed a protein SDS-PAGE profile formed by bands of approximately 30, 32, 59
288 and 67 kDa, which were different from the protein profile of the rest of the studied species. In
289 this sense, the different protein profile observed allowed us to differentiate among the 5 thistle
290 species from Asteraceae family studied. Therefore, the analysis of proteins by SDS-PAGE
291 could be considered as a potentially useful tool for characterizing thistle species belonging
292 Asteraceae family studied.

293

294 3.2. FZCE protein profile to identify *C. cardunculus* from other thistle species

295 To explore the potential of the FZCE method to distinguish thistle Asteraceae species, the inter-
296 species differences were evaluated. The electropherograms obtained by FZCE under the
297 optimized conditions had a total of 24 well-defined peaks for all of the species analyzed (Figure
298 1). As seen in Table 4, qualitative and quantitative differences were detected by comparing the
299 electropherograms of the thistle Asteraceae batches. The analysis of methanol-soluble proteins
300 from the *Silybum marianum* species showed of the peaks 8, 9, 12 and 14, not detected in the
301 other species studied. *Onopordum nervosum* shows peaks 1, 4, 6, 22 and 24 not detected in the
302 other thistle batches. Likewise, peaks 11 and 15 showed significant differences between batches
303 of the *O. nervosum* and *Cynara* species. *C. humilis* species showed of the peaks 3, 5, 7 and 23
304 absent in the other *Cynara* species. Peak 15 was significantly greater for *C. humilis* and *C.*

305 *scolymus* respect to *C. cardunculus*. The area of the peak 16 was greater in the *C. cardunculus*
306 and *C. scolymus* than for *C. humilis*, whereas, peak 21 was significantly greater in the *C. humilis*
307 samples. On the other hand, *C. cardunculus* and *C. scolymus* showed similar profiles, in fact,
308 both species show the same peaks defining their profiles, except for peak 15, which was
309 significantly greater for *C. scolymus* than for *C. cardunculus*. This similarity between *C.*
310 *cardunculus* and *C. scolymus* is justified by these species had a common ancestor (Foury, 1989;
311 Rottenberg and Zohary, 1996; Raccuia et al., 2004). The peak 11 of *C. cardunculus*, *C.*
312 *scolymus* and *C. humilis* could be included the purified cardosins A and B (Ordiales et al.,
313 2012). However, other peaks such as 15, 16 and 17 could correspond to cardosins with different
314 charge due to the different glycosylation levels (Sidrach et al., 2005). In fact, these mentioned
315 peaks showed both symmetries and absorbance spectra similar to the purified cardosins.
316 Therefore, these results showed that the FZCE method is able to discriminate thistle species
317 from Asteracea family. The effectiveness of this technique the FZCE in discriminating of
318 vegetable varieties have been previously described for authentication of the smoked paprika and
319 the “Picota” type sweet cherry varieties (Hernández et al., 2007; Serradilla et al., 2008).

320 Therefore thistle Asteraceae species studied can be distinguished by their FZCE protein profile,
321 as much for the migration time peaks, as for the area of the peaks. This analytical method could
322 be used to identify the origin of the dried flower batches bought by cheese factories, in order to
323 avoid fraud, and guarantee the authenticity of vegetable rennet used in the PDO “Torta del
324 Casar” manufacture.

325

326 *3.3. Proteolytic activity of different Asteraceae species and their relationship with the* 327 *CE and SDS-PAGE profiles*

328 In Figure 2 appear the proteolytic activity of the aqueous extracts from the thistle samples
329 studied of each Asteraceae species on α , β and κ -casein. The value α -casein degradation, *C.*
330 *cardunculus* hydrolyzed this casein in an 89.83%, which was a stronger proteolytic activity than

331 the rest of the species, except for *C. scolymus* (80.56%). In concern to κ -casein degradation, *C.*
332 *scolymus*, *C. humilis* and *C. cardunculus* could degrade it almost totally, 100%, 89.38% and
333 99.74%, respectively, and this proteolytic activity was significantly higher than *O. nervosum*
334 (67.49%) and *S. marianum* (44.92%). Respect to β -casein % of degradation of *C. cardunculus*
335 and *O. nervosum* was slightly higer than the rest of the species, but no significant differences
336 were found. Tavaría et al. (2001) reported that *C. cardunculus* a higher proteolytic activity on α -
337 than on β -casein, but the values of the degradation percentage were generally lower than those
338 found in our study. Cavalli et al. (2005) reported that *S. marianum* extract produced extensive
339 degradation of α s-caseins but only a slighter degradation of β -casein, but we observed that the
340 most degraded casein by this species was β -casein. In this sense, Sousa and Malcata (1998)
341 found similar rates of hydrolysis on α - and β -casein by dry flowers of *C. cardunculus*. In our
342 study, proteolytic activity observed for *C. cardunculus* was higher, than the rest of the thistle
343 species from Asteraceae family, for the three caseins studied.

344 The PCA analysis of the FZCE and SDS-PAGE profiles and proteolytic activity on α , β and κ -
345 caseins showed major differences between Asteraceae species (Figure 3). The first axis
346 accounted for 22.38 % of the variance and was mainly defined by proteolytic activity on α and
347 κ -caseins, SDS-PAGE bands of 16.7, 28.3, 30.2 and 60.2 kDa, and the FZCE peaks 10, 11, 13,
348 15, 16, 17 and 20. These variables would be strongly correlated between them. The second axis
349 (PC2, 16.29 % of the variance) includes FZCE peaks 3, 5, 21 and 23, SDS-PAGE bands of 45
350 and 55 kDa and the proteolytic activity on β -casein (% degradation). These parameters FZCE
351 peaks 8, 9, 12 y 14, and SDS-PAGE bands 35 y 64 kDa were clearly associated with samples of
352 *S. marianum*, whereas FZCE peaks 1, 4, 6, 7, 22 y 24, and SDS-PAGE bands of 30, 32, 59 y 67
353 kDa were related to *O. nervosum*. Proteolytic activity on α , β and κ -caseins were explained by
354 the positive axis of PC1 and were associated with samples of *C. cardunculus* and *C. humilis*,
355 which could indicate the increased proteolytic activity of these varieties

356 3.4. Proteolytic activities and milk-clotting activity of the aqueous extracts of *C.*
357 *cardunculus* and their relationship with the SDS-PAGE profiles

358 Table 5 lists the milk-clotting and proteolytic activities of the aqueous extracts from the cardoon
359 samples studied at different stages, locations, and years of harvest. The value ranges of milk-
360 clotting are 0.120–0.235 and 0.148–0.282 RU/ml for 1 and 24 h of maceration, respectively.
361 Extracts of *C. cardunculus* collected in Portugal showed milk-clotting values around 18
362 R.U./ml, when prepared 15 times more concentrated (Tavaria et al., 2001). In our study to the
363 factor investigated maturation stage, no significant differences were found in milk-clotting
364 values or in proteolytic activities on the casein fractions. Nevertheless, as for the factor
365 investigated location, the samples of location 16 showed the highest mean values ($P < 0.05$)
366 after 1 h maceration, while considering milk-clotting values for extracts prepared after 24 h
367 maceration, samples from location L6 showed the highest mean values ($P < 0.05$). Respect to
368 the proteolytic activity, samples collected in L19 showed the highest degradation values (%)
369 against the three caseins studied. Similar results were found for samples collected in locations
370 L14 and L16 against α -casein ($P < 0.05$). Cordeiro et al. (1994) studied the proteolytic and milk-
371 clotting activities of mature flower extracts collected at 8 different locations in Portugal, which
372 showed some variation in proteolytic activity while the milk-clotting activity was essentially the
373 same for all extracts. With respect to the factor investigated year of harvest, samples harvested
374 in 2009 showed higher proteolytic activity on β and κ -casein than samples collected in 2007 and
375 2008.

376 Table 6 lists the correlations between the analytical parameters (SDS-PAGE band intensities)
377 and the milk-clotting and proteolytic activities. The intensities of SDS-PAGE bands were not
378 correlated with clotting activities. Bands 6 and 7, of 32 and 30.2 kDa respectively were strongly
379 and positively correlated with all caseins degradation. Moreover, 55 kDa and 13.5 kDa bands
380 were positively correlated with β - and κ -casein degradation. Positive correlations were also
381 found between intensities of the bands of 60.2 and 20.7 kDa and proteolytic activity against β -
382 casein.

383 The proteolytic activity on α , β and κ -casein by SDS-PAGE comparing the protein
384 patterns of the 140 *Cynara cardunculus* plants harvested in 2007, 2008 and 2009 yielded five

385 clusters (Figure 4). The cardoon cluster or group number 1 is characterized by a strong
386 degradation of α (72.13%) and k (83.33%) -casein and a very slight degradation of β -casein. A
387 total of 9.3% of the samples belonged to this first group, with an average of clotting activity of
388 0.115 RU after 1 hour of maceration, and 0.142 RU after 24 hours of maceration. A 69.23 % of
389 the samples of this group were harvested in 2007, and a 69.23 % of samples were collected in
390 the flower ripening stage “c”. The most of the samples belonging cluster 1 was picked up in
391 localization L14. The second cluster, on the other hand, includes a 49.3% of the *C. cardunculus*
392 samples, which are able to degrade both caseins in an 88.02%, 65.98% and 91.76%
393 respectively, so these samples could be considered the most proteolytic plants. They showed the
394 highest values of clotting activity, 0.182 and 0.227 RU after 1 hour and 24 hours of maceration,
395 respectively. A 53.6% of these samples were collected in 2007, and a 47.8% of them belonged
396 to flower ripening stage “b”. The most of these samples were harvested in localizations L2 and
397 L6. With respect to cluster 3, the samples grouped (8.6%) can’t degrade the caseins more than
398 50% in all cases. These samples showed a clotting activity of 0.132 RU (1 hour of maceration)
399 and 0.186 RU (24 hours of maceration). The most of these samples were picked up in 2008,
400 while a 50% of them were corresponded with flower ripening stage “c”. A third part of the
401 samples of this cluster was harvested in the location L1, other third in L6 and last third between
402 L2 y L19. The samples in the cluster 4 (25.7%) showed a high degradation of α (85.35%) and β
403 (70.38%)-casein and a lower capacity to degrade k-casein (38.85%). Its clotting activity of
404 0.156 RU and 0.180 RU after 1 hour and 24 hours of maceration. The 55.6% of the samples
405 were harvested in 2007, and a 52.8% of the samples were picked up in flower ripening stage
406 “b”. The most of these samples (41.7%) were grown in localization L2. Lastly, samples in
407 cluster 5 (7.1%) showed very low degradation of β (4.25%) and k (8.31%)-casein, and slight
408 degradation of α -casein (51.22%). The average clotting activity for these samples was 0.158 RU
409 and 0.194 RU after 1 hour and 24 hours respectively. The most of these samples (70%) were
410 harvested in 2007, and a 50 % of them belonged to flower ripening stage “b”. A 30% of the
411 samples of cluster 5 were collected in the location L3 and the same percentage in L5.

412

413 3.5. Antimicrobial activity of aqueous extracts of *C. cardunculus*.

414 The aqueous extracts from dried flowers of *C. cardunculus*, used as vegetable rennet in the
415 Torta del Casar cheese-making, don't showed an inhibitory effect on selected microorganisms
416 studied.

417

418 **Conclusions**

419 It is possible to distinguish between Asteraceae species applying FZCE and SDS-PAGE
420 analysis, as each species is defined by a FZCE and SDS-PAGE characteristic protein profile,
421 which allows us differ these species. These different protein profiles are involved in the
422 different proteolytic activity of each Asteraceae species on milk caseins.

423 These results show that there is high variability among *Cynara cardunculus* populations,
424 concerning its ability to degrade milk caseins in the cheese-making of Torta del Casar, therefore
425 it would be necessary to know which of the plants have a desirable influence on the whole
426 process and the sensory attributes of Torta del Casar cheese, with the aim of growing this plants
427 under controlled conditions and cheese factories, associated to PDO, could have available the
428 best *C. cardunculus* plants for producing the vegetable rennet with the desirable technological
429 quality.

430

431 **Acknowledgements**

432 The authors are grateful to M. Cabrero and C. Cebrián for technical assistance and PDO "Torta
433 del Casar" for technical support.

434

435 **References**

- 436 Ariza-Espinar, L., Delucchi, G. (1998). 280 Asteraceae, parte II. Tribu XL. Cardueae. In L.
437 Ariza-Espinar (Ed.), Flora Fanerogámica Argentina (pp.24-25). Córdoba: Pro Flora.
- 438 Barnwell, P.; McCarthy, P.K.; Lumley, I.D.; Griffin, M. (1994). The use of Reverse-phase High
439 Performance Liquid Chromatography to detect common wheat (*Triticum aestivum*)
440 adulteration of durum wheat (*Triticum durum*) pasta products dried at low and high
441 temperatures. *J. Cereal Sci.*, 20, 245-252.
- 442 Bean, S. R. and Lookhart, G. L. (2001). Recent developments in high performance capillary
443 electrophoresis of cereal proteins. *Electrophoresis*, 22, 1503-1509.
- 444 Bietz, J.A. (1994). Fractionation of wheat gluten proteins by capillary electrophoresis. In *Gluten*
445 *Proteins*; Association of Cereal Research: Detmold, Germany, pp 404 - 413.
- 446 Brodelius, P.E.; Cordeiro, M.C.; Pais, M.S. (1995). Aspartic proteinases (cyprosin) from
447 *Cynara cardunculus* spp. *flavescens* cv. cardoon; purification, characterisation, and
448 tissue-specific expression. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 362, 255 – 266.
- 449 Cavalli, S. V., Claver, S., Priolo, N., and Natalucci, C. (2005). Extraction and partial
450 characterization of a coagulant preparation from *Silybum marianum* flowers. Its action
451 on bovine caseinate. *Journal of Dairy Research*, 72, 271-275.
- 452 Cancalon, P.F. (1995). Capillary electrophoresis: a useful technique for food analysis. *Food*
453 *Technol-Chicago*, 49, 52-58.
- 454 Cattaneo, T.M.P., Nigro, F., Toppino, P.M. & Denti, V. (1996). Characterization of ewe's milk
455 by capillary electrophoresis. *J. Chromatography, A* 721, 345-349.
- 456 Cordeiro, M.C.; Xue, Z.T.; Pietrzak, M.; Pais, M.S.; Brodelius, P.E. (1994). Isolation and
457 characterization of an cDNA from flowers of *Cynara cardunculus* encoding cyprosin (an
458 aspartic proteinase) and its use to study the organ-specific expression of cyprosin. *Plant*
459 *Mol. Biol.*, 24, 733-741.
- 460 Cordeiro, M.; Lowther, T.; Dunn, B.M.; Guruprasad, K.; Blundell, T.; Pais, M.S.; Brodelius,
461 P.E. (1998). Substrate specificity and molecular modelling of aspartic proteinases
462 (cyprosin) from flowers of *Cynara cardunculus* subsp. *flavescens* cv. cardoon. *Adv.*
463 *Exp. Med. Biol.*, 436, 473 – 479.

464 Delgado, F.J., González-Crespo, J., Cava, R., García-Parra, J., Ramírez, R. (2009).
465 Characterization by SPME-GC-MS of the volatile profile of a Spanish soft cheese
466 P.D.O. Torta del Casar during ripening. Food Chemistry, 118, 182-189.

467 Domingos, A., Xue, Z. T., Guruprasad, K., Clemente, A., Blundell, T., Pais, M. S. (1998). An
468 aspartic proteinase from flowers of *Centeurea calcitrapa*. Purification, characterization,
469 molecular cloning, and modeling of its three-dimensional structure. Advances in
470 Experimental Medicine and Biology 436, 465-472.

471 Egito, A. S., Girardet, J. M., Laguna, L. E., Poirson, C., Mollé, D., Miclo, L., Humbert, G., y
472 Gaillard, J. L. (2007). Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and
473 albizia seeds and hydrolysis of bovine κ -casein. International Dairy Journal, 17, 816-
474 825.

475 Fernández-Salguero, J., and Sanjuán, E. (1999). Influence of vegetable and animal rennet on
476 proteolysis during ripening in ewe's milk cheese. Food Chem. 64, 177-183.

477 Flurer, C. L., Crowe, J. B., and Wolnik, K. A. (2000). Detention of adulteration of locust bean
478 gum with guar by capillary electrophoresis and polarized light microscopy. Food
479 Additives and Contaminants, 17, 3-15.

480 Foury, C. (1989) Ressources genetiques et diversification de l'artichaut (*Cynara scolymus* L.).
481 Acta Hortic. 242, 155-166.

482 Heimgartner, U., Pietrzak, M., Geertsen, R., Brodelius, P., Silva Figueredo, A.C. and Pais, M.S.
483 (1990). Purification and partial characterization of milk clotting proteases from flowers
484 of *Cynara cardunculus*. Phytochemistry 29, 1405-1410.

485 Hernández, A., Martín, A., Aranda, E., Bartolomé, T., Córdoba M.G. (2006). Detection of
486 smoked paprika "Pimentón de la Vera" adulteration by Free Zone Capillary
487 Electrophoresis (FZCE). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54 (12), 4141-
488 4147.

489

490 Hernández, A., Martín, A., Aranda, E., Bartolomé, T., Córdoba M.G. (2007). Application of
491 temperature-induced phase partition of proteins for the detection of smoked paprika
492 adulteration by free zone capillary electrophoresis (FZCE). *Food Chemistry*, 105, 1219-
493 1227.

494 Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of
495 bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

496 Manabe, T. (1999). Capillary electrophoresis of proteins for proteomic studies. *Electrophoresis*,
497 20, 3116-3121.

498 Ordiales, E., Martín, A., Benito, M. J., Hernández, A., Ruíz-Moyano, S., and Córdoba, M. G.
499 (2012). Technological characterisation by free zone capillary electrophoresis (FZCE) of
500 the vegetable rennet (*Cynara cardunculus*) used in “Torta del Casar” cheese-making.
501 *Food Chemistry*, 133, 227-235.

502 Otte, J., Ardö, Y., Weimer, B. & Sorensen, J. (1999). Capillary electrophoresis used to measure
503 proteolysis in cheese. *Bulletin International Dairy Federation*, 337, 10-16.

504 Pereira, C. S., Soares da Costa, C., Pereira, S., Moura Nogueira, F., Albuquerque, P. M.,
505 Teixeira, J., Faro, C., Pizarra, J. (2008). Cardosins in postembryonic development of
506 cardoon: towards an elucidation of the biological function of plant aspartic proteinases.
507 *Protoplasma* 232, 203-213.

508 Pires, E.; Faro, C.; Macedo, I.; Esteves, C.; Morgado, J.; Veríssimo, P.; Dias – Pereira; Gomes,
509 D. (1994). Flor do cardo versus quimosina no fabrico de queijos artesanais. *Revista da*
510 *Sociedade Portuguesa de Química*, 54, 66 – 68.

511 Ramalho- Santos, M., Pizarra, J. Veríssimo, P., Pereira, S., Salema, R., Pires, E., y Faro, C.
512 (1997). Cardosin A, an abundant aspartic proteinase, accumulates in protein storage
513 vacuoles in the stigmatic papillae of *Cynara cardunculus L.*, *Planta* 203, 204-212.

514 Ramalho- Santos, M., Veríssimo, P., Cortes, L., Samyn, B., Van Beeumen, J., y Pires, E.
515 (1998). Identification and proteolytic processing of procardosin A. *Eur. J. Biochem.*
516 255, 133-138.

517 Raccuia, S. A., Mainolfi, A., Mandolino, G., Melilli, M. G. (2004a). Genetic diversity in
518 *Cynara cardunculus* L. revealed by AFLP markers: comparison between cultivars and
519 wild types from Sicily. *Plant Breed.* 123, 280-284.

520 Recio, I., Amigo, L. & López-Fandiño, R. (1997). Assessment of the quality of dairy products
521 by capillary electrophoresis of milk proteins. *Journal of Chromatography, B* 697, 231-
522 242.

523 Recio, I., Ramos, M. & López-Fandiño, (2001). R. Capillary electrophoresis for the analysis of
524 food proteins of animal origin. *Electrophoresis*, 22, 1489-1502.

525 Regulation (CE) 1491/2003 of European Commission of 25 of August: Registration of the
526 Protected Designation of Origin “Torta del Casar” in the Register of Protected
527 Designations of Origin and the Protected Geographic Indications.

528 Roseiro, L.B.; Barbosa, M.; Ames, J. A.; Wilbey, R.A. (2003). Cheesemaking with vegetable
529 coagulants – the use of *Cynara* L. for the production of ovine milk cheeses. *Int. J. Dairy*
530 *Technol.*, 56, 76 – 85.

531 Rottenberg, A., and Zohary, D. (1996). The wild ancestry of the cultivated artichoke. *Genet.*
532 *Resour. Crop. Evol.* 43, 53-58.

533 Serradilla, M.J.; Martín, A.; Aranda, E.; Hernández, A.; Benito, M. J.; López-Corrales, M.;
534 Córdoba, M.G. (2008). Authentication of “Cereza del Jerte” sweet cherry varieties by
535 free zone capillary electrophoresis (FZCE). *Food Chem.* 111, 457-461.

536 Sidrach, L., García – Canovás, F., Tudela, J. & Rodríguez – López, J.N. (2005). Purification of
537 cynarases from artichoke (*Cynara scolymus*, L.): enzymatic properties of cynarase A.
538 *Phytochemistry*, 66, 41 – 49.

- 539 Silva, S.V.; Malcata F.X. (1999). On the activity and specificity of cardosin B, a plant
540 proteinase on ovine caseins. *Food Chem.*, 67, 373 – 378.
- 541 Silva, S.V., Malcata, F.X. (2000). Comparative catalytic activity of two plant proteinases upon
542 caprine caseins in solution. *Food Chemistry*, 71, 207-214.
- 543 Sousa, M.J.; Malcata, F.X. (1998). Proteolysis of ovine and caprine caseins in solution by
544 enzymatic extracts from flowers of *Cynara cardunculus*. *Enzyme and Microb. Technol.*,
545 22, 305-314.
- 546 Skarpied, H-J.; Moe, R.E.; Indahl, U.G. (2001). Detection of mechanically recovered meat and
547 head meat from cattle in ground beef mixtures by multivariate analysis of isoelectric
548 focusing protein profiles. *Meat Sci.*, 57, 227-234.
- 549 Tamer, I. M. (1993). Identification and partial purification of a novel milk clotting enzyme from
550 *Onopodium turcicum*. *Biotechnol. Lett.* 4, 427-432.
- 551 Tavaría F.K.; Sousa, M.J.; Malcata, F.X. (2001). Storage and lyophilization effects of extracts
552 of *Cynara cardunculus* on the degradation of ovine and caprine caseins. *Food Chem.*,
553 72, 79 – 88.
- 554 Toorop, R.M.; Murch, S.J.; Ball, R. O. (1997). Development of a rapid and accurate method for
555 separation and quantification of myofibrillar proteins in meat. *Food Res. Int.*, Vol. 30,
556 Nº 8, pp. 619-627.
- 557 Valdés, B., Talavera, S. y Fernández-Galiano, E. (1987). En: *Flora Vascular de Andalucía*
558 Occidental. Ketres Editora, S.A. Barcelona. España.
- 559 Veríssimo, P.; Esteves, C.; Faro, C.; Pires, E. (1995). The vegetable rennet of *Cynara*
560 *cardunculus* L. contains two proteinases with chymosin and pepsin-like specificities.
561 *Biotechnol. Lett.*, 17, 621 – 626.
- 562 Vieira, M., Pissarra, J., Veríssimo, P., Castanheira, P., Costa, Y., Pires, E. and Faro, C. (2001).
563 Molecular cloning and characterization of cDNA encoding cardosin B, an aspartic

564 proteinase accumulating extracellularly in transmitting tissue of *Cyanra cardunculus*, *L.*
565 *Plant. Mol. Biol.* 45, 529-539.

566 Vioque, M., Gómez, R., Sánchez, E., Mata, C., Tejada, L., and Fernández – Salguero, J. (2000).
567 Chemical and microbiological characteristics of ewe’s milk cheese manufactured with
568 extracts from flowers of *Cynara cardunculus* and *Cynara humilis* as coagulants. *J.*
569 *Agric. Food Chem.* 48, 451-456.

570 White, P.C.; Cordeiro M.C.; Arnold, D.; Brodelius, P.E.; Kay, J. (1999). Processing, activity,
571 and inhibition of recombinant cyprosin, as aspartic proteinase from cardoon (*Cynara*
572 *cardunculus*). *J. Biol. Chemistry*, 274, 16685 – 16693.

573

574

575

576

577

578

579

580 Figure 1. FZCE protein profiles of different species. 1. *Silybum marianum*; 2.
581 *Onopordum nervosum*; 3. *Cynara humilis*; 4. *Cynara cardunculus*; 5. *Cynara scolymus*.

582 Figure 2. Proteolytic activity of flower extracts of different thistle Asteraceae species
583 studied on milk caseins by SDS-PAGE. A2: *Silybum marianum*; A6: *Cynara humilis*;
584 A61, A19: *Onopordum nervosum*; A33, A45, A28: *Cynara cardunculus*; A64: *Cynara*
585 *scolymus* (A). Proteolytic activity of flower extracts of different thistle Asteraceae
586 species studied on milk caseins, expressed in % degradation (B).

587 Figure 3. Principal component analysis of the FZCE and SDS-PAGE profiles and
588 proteolytic activity on α , β and κ -caseins of extracts from Asteraceae species: plane 1–2
589 of variable plot (A); Distribution of thistle Asteraceae species samples according to
590 plane 1–2 of a factorial correspondence analysis (B).

591 Figure 4. Dendrogram of *Cynara cardunculus* samples grouped according to their
592 proteolytic activity on milk caseins.

593

594

595

596

597

598

599

600

601

602 Table1. Morphological characterization of thistle species studied from Asteraceae
 603 family.

	<i>Silybum marianum</i>	<i>Onopordon nervosum</i>	<i>Cynara humilis</i>	<i>Cynara cardunuculus</i>	<i>Cynara scolymus</i>
Plant height (m)	3	3	0.2 - 0.6	0.4 - 1	1.4 - 2
Stem		Square section, green – white colored, and column form	Striated lengthwise	Striated lengthwise, 35 mm, yellowish spines	Striated lengthwise and brunched
Leaves	Alternate, sessile, pinnate and spiny	Lobulated, pinnatisect and spiny	Spiny margin, deeply pinnate, tomentose underside	Pinnatisects, peciolated, with ovoid segments at bottom and upper leaves are sessile, tomentose underside	Arching, deeply lobed, silvery, glaucous-green, 50-82 cm long
Involucre		with an erect, lanceolated, flat and spiny bracts files	Globose with several leathery bracts files	Globose	Globose
Bracts	Intermediate bracts line with a terminal spine	Leathery, serrated margin	Purple, lanceolated	Several ovate – lanceolated, leathery, erect bract files, with spiny peak	Pointed, leathery green
Capítulas	Solitary discoid	Branches, ovoid.	Discoid, terminal and solitary	2-6 discoid panicles	Round but slightly elongated
Flowers	Purple	Purple-pink	Blue or white	Blue	Purple-blue
Achenes	Ovoid, smooth with an apical collar white colored. Pappus (15-22 mm) with several hair lines, soldered in a basal ring	Obovoid, pink or white, feathery pappus (5,5-10 (14)) mm	Pyramid, tetragon with four winged ribs in the upper part. Feathery pappus (30-40 mm) in the base and rough in the tip	Obovoid (6-7 mm), smooth, with 2-4 ribs. Feathery pappus (25-35 mm) in the base and rough in the tip	Obovoid, smooth, gray color. Feathery pappus in the base and rough in the tip

604

605

606

607 Table 2. Samples of different thistle species from Asteraceae family studied, according
 608 to the maturation stage, year and localization of harvest.

Code	Specie	Maduration Stage ¹	Year	Localization	N°	
A1	<i>S. marianum</i>	b	2006	L7	Talayuela	1
A2	<i>S. marianum</i>	b	2006	L1	Balboa-Talavera	1
A3	<i>S. marianum</i>	b	2006	L2	Ctra. Mérida-Madrid	1
A4-A5	<i>Cynara humilis</i>	b	2006	L4	Canal Lobón	2
A6-A11	<i>Cynara humilis</i>	b	2006	L8	Ctra. Cáceres	6
A12-A13	<i>Cynara humilis</i>	b	2006	L9	Villar del Rey	2
A14-A17	<i>O. nervosum</i>	b	2006	L10	Badajoz	4
A18-A20	<i>O. nervosum</i>	b	2006	L1	Balboa-Talavera	3
A21	<i>O. nervosum</i>	b	2006	L11	Berlanga	1
A22	<i>C. scolymus</i>	b	2006	L12	Cáceres	1
A23	<i>C. cardunculus</i>	b	2006	L5	Puebla de la Calzada	1
A24-A26	<i>C. cardunculus</i>	b	2006	L13	Villafranco del Guadiana	3
A27-A29	<i>C. cardunculus</i>	b	2006	L11	Berlanga	3
A30-A31	<i>C. cardunculus</i>	b	2006	L6	Sancha Brava	2
A32-A36	<i>C. cardunculus</i>	b	2006	L14	Montijo – La Nava S.	5
A37-A39	<i>C. cardunculus</i>	b	2006	L3	La Albuera	3
A40-A41	<i>C. cardunculus</i>	b	2006	L15	Santa Marta-Solana	2
A42	<i>C. cardunculus</i>	b	2006	L16	Cruce Montijo	1
A43-A54	<i>C. cardunculus</i>	b	2006	L2	Ctra. Mérida - Madrid	12
A55-A56	<i>Cynara humilis</i>	b	2006	L10	Badajoz	2
A57-A60	<i>Cynara humilis</i>	b	2006	L17	Casar de Cáceres	4
A61-A62	<i>O. nervosum</i>	b	2006	L1	Balboa-Talavera	2
A63-A65	<i>C. scolymus</i>	b	2006	L13	Villafranco del Guadiana	3
A66-A70	<i>C. cardunculus</i>	b (2) ² , c (3)	2007	L5	Puebla de la Calzada	5
A71-A79	<i>C. cardunculus</i>	a (4), b (2), c (3)	2007	L3	La Albuera	9
A80-A94	<i>C. cardunculus</i>	a (5), b (4), c (6)	2007	L6	Sancha Brava	15
A95-A109	<i>C. cardunculus</i>	a (4), b (8), c (3)	2007	L14	Montijo – La Nava S.	15
A110-123	<i>C. cardunculus</i>	a (4), b (3), c (7)	2007	L16	Cruce Montijo	14
A124-140	<i>C. cardunculus</i>	b (12), c (5)	2007	L2	Ctra. Mérida - Madrid	17
A141-142	<i>C. cardunculus</i>	b	2008	L12	Cáceres	2
A143-148	<i>C. cardunculus</i>	b (2), c (4)	2008	L18	La Orden-Guadajira	6
A149-159	<i>C. cardunculus</i>	b (3), c (8)	2008	L1	Balboa-Talavera	11
A160-168	<i>C. cardunculus</i>	b (6), c (3)	2008	L14	Montijo – La Nava S.	9
A169-183	<i>C. cardunculus</i>	b (8), c (7)	2008	L2	Ctra. Mérida-Madrid	15
A184-189	<i>C. cardunculus</i>	b (3), c (3)	2008	L3	La Albuera	6
A190-197	<i>C. cardunculus</i>	b (4), c (4)	2008	L6	Sancha Brava	8
A198-205	<i>C. cardunculus</i>	b (4), c (4)	2009	L19	Alcántara	8
				Total	205	

609 ¹ a: flower is opening, only some styles and stigmas are visible; b: flower fully open, even with pollen; c:
 610 flower begins to dry, so some styles and stigmas are brownish; stigmas and styles are dried.

611 ² (X): number of samples, harvested in indicated year and location and in the maturation stage
 612 symbolized by a, b, c or d.

613 ³ Geographic coordinates: L1: 38° 54' 8,82" N 6° 43' 59,9" W, L2: 38° 50' 34,8" N 6° 57' 39,73" W, L3:
 614 38° 45' 6,73" N 6° 48' 10,42" W, L4: 38° 52' 29,07" N 6° 45' 11,50" W, L5: 38° 53' 59,94" N 6° 51'
 615 12,43" W, L6: 38° 56' 32,78" N 6° 20' 23,16" W, L7: 39° 59' 7,44" N 5° 35' 21,59" W, L8: 39° 19' 30,53"
 616 N 6° 29' 54,41" W, L9: 39° 8' 5,03" N 6° 51' 13,63" W, L10: 38° 54' 23,07" N 6° 58' 15,10" W, L11: 38°
 617 17' 23,93" N 5° 49' 48,00" W, L12: 39° 26' 19,40" N 6° 22' 52,95" W, L13: 38° 53' 55,65" N 6° 53'
 618 15,99" W, L14: 38° 55' 20,77" N 6° 35' 57,79" W, L15: 38° 37' 55,93" N 6° 37' 0,20" W, L16: 38° 55'
 619 16,44" N 6° 57' 23,19" W, L17: 39° 35' 31,47" N 6° 23' 30,03" W, L18: 38° 51' 17,61" N 6° 41' 20,37"
 620 W, L19: 39° 42' 25,67" N 6° 53' 5,49" W.

621

622

623 Table 3. Peak areas of proteins determined by SDS-PAGE in the studied species
 624 harvested in 2006.

Band	aprox MW	<i>Cynara cardunculus</i>	<i>Cynara scolymus</i>	<i>Cynara humilis</i>	<i>Sylibum marianum</i>	<i>Onopordom nervosum</i>	P
1	13.5	10346 ^b	41631 ^b	nd ^a	nd ^a	nd ^a	0.017
2	16.7	36866 ^b	29857 ^b	23618 ^b	nd ^a	nd ^a	0.001
3	20.7	24178 ^b	22636 ^b	nd ^a	nd ^a	nd ^a	0.002
4	28.3	20419 ^b	21558 ^b	nd ^a	nd ^a	nd ^a	0.000
5	30	nd ^a	nd ^a	nd ^a	nd ^a	16878 ^b	0.004
6	30.2	96704 ^b	85583 ^b	87591 ^b	nd ^a	nd ^a	0.000
7	32	25331 ^c	28314 ^c	nd ^a	nd ^a	9782 ^b	0.000
8	35	nd ^a	nd ^a	nd ^a	9123 ^b	nd ^a	0.000
9	37.3	13154 ^b	12577 ^b	nd ^a	nd ^a	nd ^a	0.000
10	45	8909 ^b	9026 ^a	nd ^a	8567 ^b	nd ^a	0.003
11	55	4924 ^b	5213 ^a	5607 ^b	nd ^a	nd ^a	0.001
12	59	nd ^a	nd ^a	nd ^a	nd ^a	2690 ^b	0.000
13	60.2	10256 ^b	7271 ^b	1617 ^c	nd ^a	nd ^a	0.000
14	64	nd ^a	nd ^a	nd ^a	7179 ^b	nd ^a	0.000
15	66.2	12371 ^b	nd ^a	6761 ^b	nd ^a	nd ^a	0.000
16	67	nd ^a	nd ^a	nd ^a	nd ^a	5948 ^b	0.003

625 ^{a, b, c} Means in lines without common letters are significantly different (p<0,05).

626

627

628

629

630

631

632 Table 4. Analytical parameters and peak areas of proteins determined by FZCE under
 633 optimized conditions in different species studied harvested in 2006.

Peak	migration time peak		UAA ^a					P
	CMT ^b	RDS ^c %	<i>Sylibum marianum</i>	<i>Onopordom nervosum</i>	<i>Cynara humilis</i>	<i>Cynara cardunculus</i>	<i>Cynara scolymus</i>	
1	8.799	5.437	0 ^a	19936 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0.000
2	9.436	3.826	0 ^a	9126 ^{ab}	0 ^a	28686 ^b	21369 ^b	0.001
3	9.037	1.504	0 ^a	0 ^a	38756 ^b	0 ^a	0 ^a	0.000
4	9.241	6.916	0 ^a	11543 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0.000
5	9.402	3.336	0 ^a	0 ^a	84587 ^b	0 ^a	0 ^a	0.000
6	9.749	6.605	0 ^a	11362 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0.000
7	10.580	6.816	0 ^a	19446 ^b	26776 ^b	0 ^a	0 ^a	0.000
8	11.372	1.337	71901 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0.000
9	11.573	1.725	1025215 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0.000
10	11.882	2.720	0 ^a	0 ^a	0 ^a	37510 ^b	47256 ^b	0.000
11	12.226	3.443	0 ^a	25361 ^a	329950 ^b	369612 ^b	294333 ^b	0.020
12	12.554	1.822	3038036 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0.000
13	13.132	2.881	0 ^a	0 ^a	60901 ^b	97861 ^b	96520 ^b	0.004
14	13.633	1.885	14519 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0.000
15	13.648	3.886	0 ^a	12919 ^a	258426 ^c	165915 ^b	262987 ^c	0.000
16	14.786	2.127	0 ^a	0 ^a	25347 ^b	132069 ^c	145542 ^c	0.001
17	15.201	2.958	0 ^a	0 ^a	245866 ^b	401758 ^b	245868 ^b	0.001
18	15.367	3.460	0 ^c	0 ^c	0 ^c	0 ^c	0 ^c	
19	15.540	2.778	0 ^c	0 ^c	0 ^c	0 ^c	0 ^c	
20	15.637	2.136	0 ^a	0 ^a	20094 ^b	29466 ^b	32118 ^b	0.016
21	15.971	1.025	0 ^a	0 ^a	1847112 ^c	86211 ^b	64138 ^b	0.000
22	16.129	2.580	0 ^a	9977 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0.000
23	16.488	1.818	0 ^a	0 ^a	57005 ^b	0 ^a	0 ^a	0.000
24	17.585	1.114	0 ^a	6199 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0.000

634

635 Table 5. Clotting and casein proteolysis activities of vegetable rennets obtained from cardoon flowers grouped according to maturation stage,
 636 location, and harvest year.

Sample grouping	Clotting activity (R.U.) after maceration				% Degradation of the PAGE-SDS bands					
	1 hour		24 hours		α -caseins		β -casein		κ -casein	
	Mean	SD	Mean	SD ¹	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Maturation stage ²										
a	0.175	± 0.069	0.199	± 0.613	80.742	± 17.914	60.225	± 27.876	64.643	± 34.658
b	0.172	± 0.078	0.202	± 0.093	82.398	± 18.075	59.017	± 27.921	69.783	± 31.293
c	0.153	± 0.062	0.201	± 0.082	78.035	± 18.523	51.001	± 28.324	68.037	± 32.655
<i>P</i> ³	0.272		0.995		0.416		0.227		0.838	
Location ²										
L1	0.141 ^{ab}	± 0.024	0.187 ^{ab}	± 0.043	74.159 ^{ab}	± 21.419	51.378 ^{abc}	± 17.668	78.140 ^{ab}	± 15.249
L2	0.156 ^{ab}	± 0.051	0.191 ^{ab}	± 0.618	84.390 ^{ab}	± 18.271	68.000 ^{ab}	± 23.827	66.718 ^{ab}	± 30.312
L3	0.169 ^{ab}	± 0.034	0.202 ^{ab}	± 0.065	73.198 ^{ab}	± 20.357	47.273 ^{abc}	± 27.813	44.317 ^{bc}	± 33.824
L5	0.179 ^{ab}	± 0.035	0.144 ^{ab}	± 0.028	55.830 ^b	± 32.814	20.496 ^c	± 28.179	4.962 ^c	± 11.095
L6	0.205 ^{ab}	± 0.083	0.282 ^a	± 0.151	74.870 ^{ab}	± 20.341	54.041 ^{abc}	± 23.761	71.018 ^{ab}	± 30.342
L12	0.206 ^{ab}	± 0.033	0.182 ^{ab}	± 0.065	74.280 ^{ab}	± 14.538	48.090 ^{abc}	± 47.716	76.160 ^{ab}	± 17.027
L14	0.120 ^b	± 0.041	0.148 ^b	± 0.041	86.328 ^a	± 8.887	42.967 ^{bc}	± 34.875	72.102 ^{ab}	± 30.906
L16	0.235 ^a	± 0.126	0.209 ^{ab}	± 0.069	86.044 ^a	± 8.257	67.492 ^{ab}	± 17.548	78.011 ^{ab}	± 30.999
L18	0.155 ^{ab}	± 0.053	0.210 ^{ab}	± 0.058	83.722 ^{ab}	± 15.626	38.797 ^{bc}	± 6.976	83.583 ^{ab}	± 11.347
L19	0.126 ^b	± 0.025	0.199 ^{ab}	± 0.037	87.864 ^a	± 9.459	87.650 ^a	± 9.357	97.941 ^a	± 2.046
<i>P</i>	0.000		0.000		0.006		0.000		0.000	
Year										
2007	0.175	± 0.086	0.212	± 0.105	81.258	± 17.832	51.850 ^b	± 30.708	69.542 ^b	± 35.831
2008	0.155	± 0.045	0.187	± 0.055	77.430	± 19.169	55.733 ^b	± 23.061	63.133 ^b	± 26.066
2009	0.126	± 0.025	0.199	± 0.037	87.867	± 9.459	87.651 ^a	± 9.357	97.941 ^a	± 2.045
<i>P</i>	0.086		0.247		0.219		0.002		0.013	

¹SD: Standard deviation.

²Maturation stage and location: as in table 1.

³P-values.

637

638 Table 6. The relevant SDS-PAGE bands of the *Cynara cardunculus* rennets studied:
 639 correlations with technological properties, proteolytic activity and clotting activity.

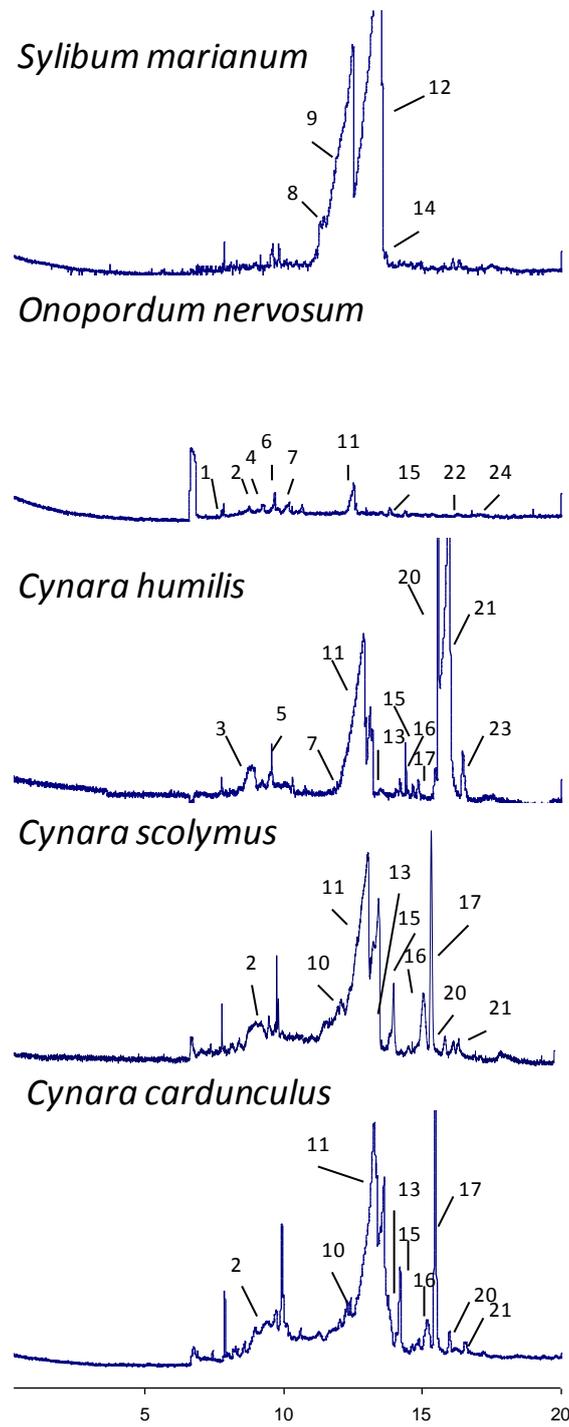
SDS- PAGE bands		Correlation				
		Clotting activity (R.U.) after maceration		Degradation of caseins (%)		
		1 hour	24 hours	α -caseins	β -casein	κ -casein
b1 ¹	66.2 ²	0.238	0.347	0.395	0.043	0.368
b2	60.2	-0.165	-0.072	0.212	0.264(*)	0.210
b3	55	-0.238	0.045	0.100	0.357(*)	0.448(**)
b4	45	-0.105	0.008	-0.323	-0.249	0.387
b5	37.3	-0.306	-0.060	-0.341	0.620(**)	0.369
b6	32	-0.047	0.012	0.264(**)	0.446(**)	0.310(**)
b7	30.2	-0.071	0.017	0.215(*)	0.369(**)	0.327(**)
b8	28.3	-0.244	-0.007	0.079	-0.031	0.282
b9	20.7	-0.414(*)	-0.204	0.154	0.458(*)	-0.002
b10	16.7	-0.221	-0.038	0.162	0.176	0.073
b11	13.5	-0.126	0.005	0.094	0.386 (**)	0.304 (*)

¹ band number (PAGE), ² kilodaltons (PAGE); * P<0.05; ** P<0.01.

640

641

642



644

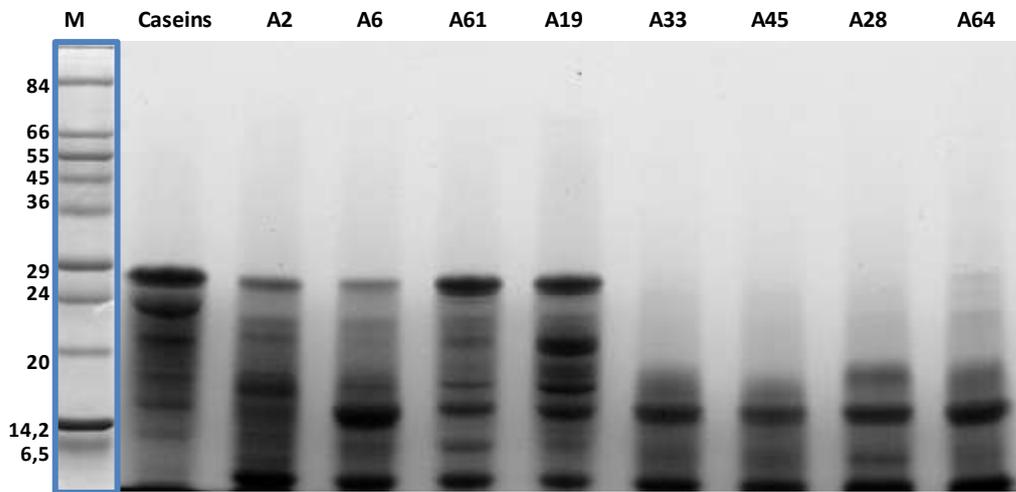
645

646

647

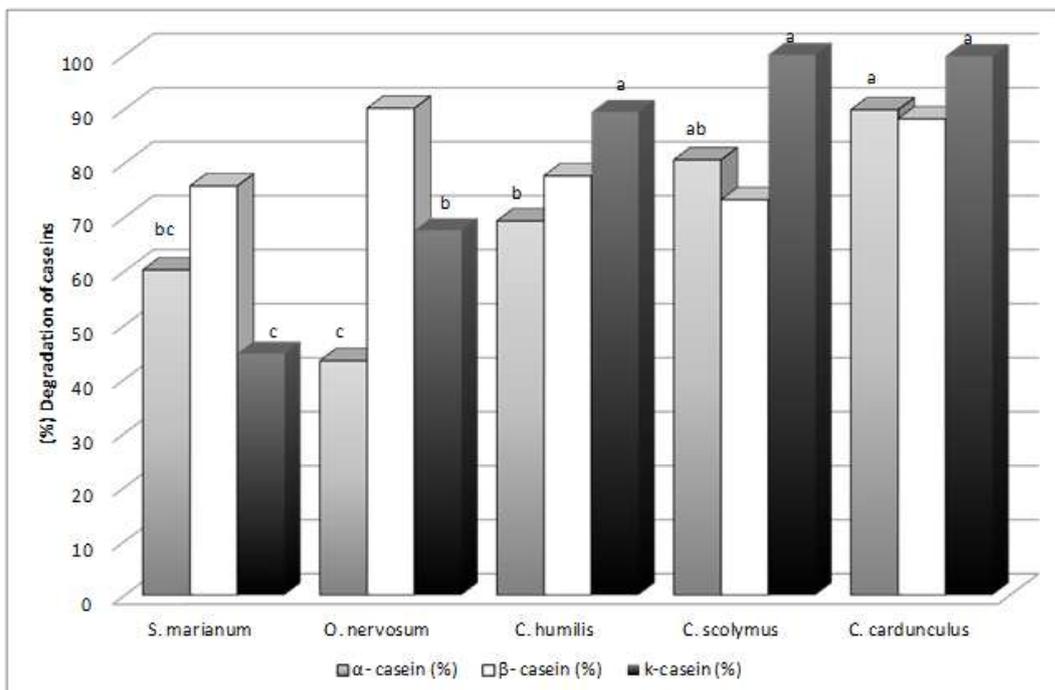
648 Figure 2.

649 A.



650

651 B.



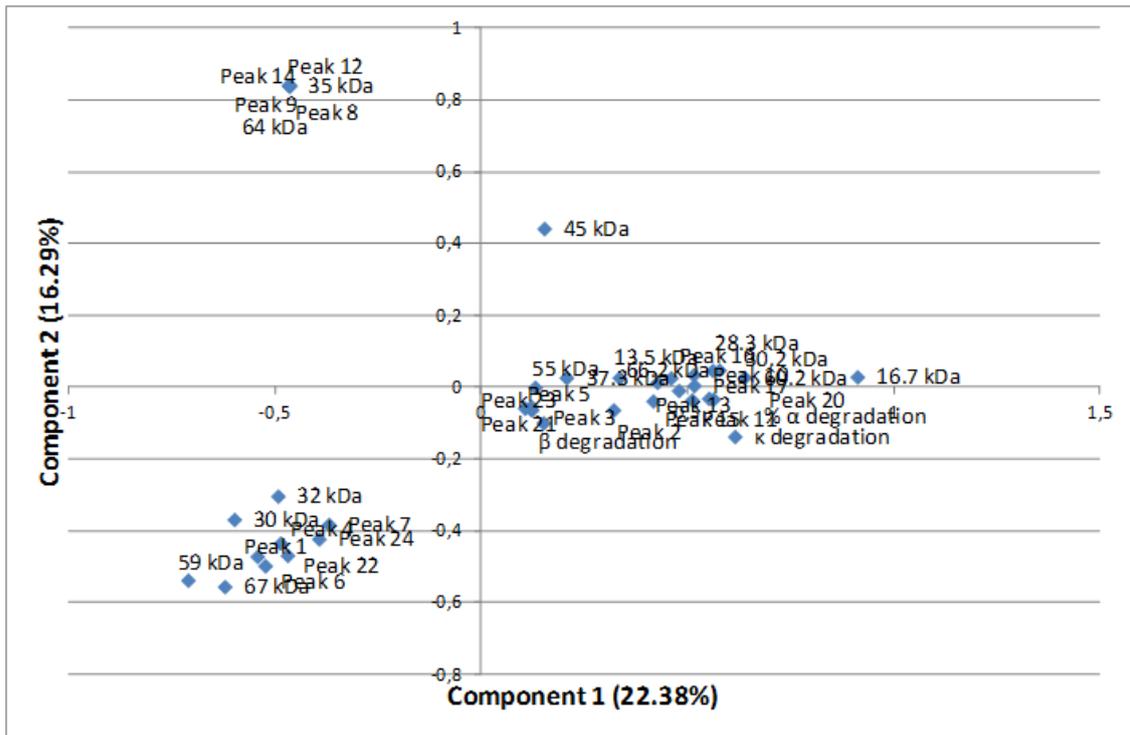
652

653 Sticks with different letters above differ significantly (P < 0.05).

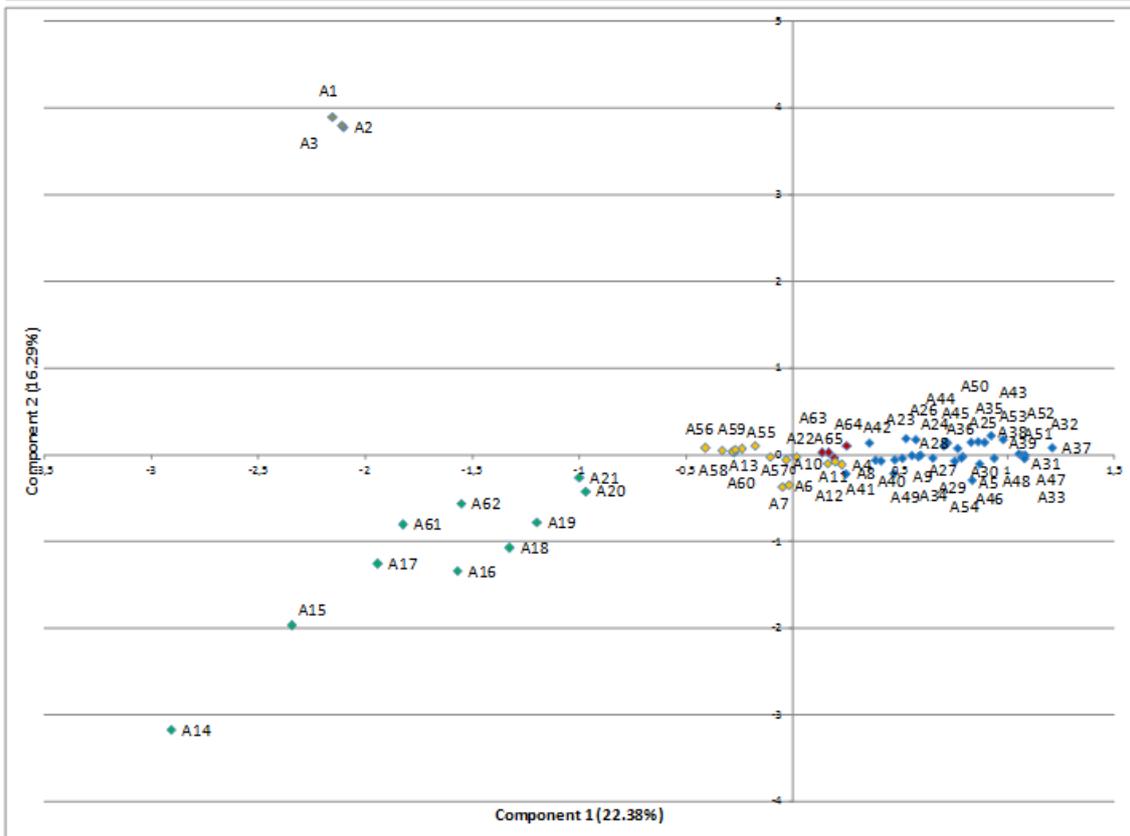
654

655

656 Figure 3.



657



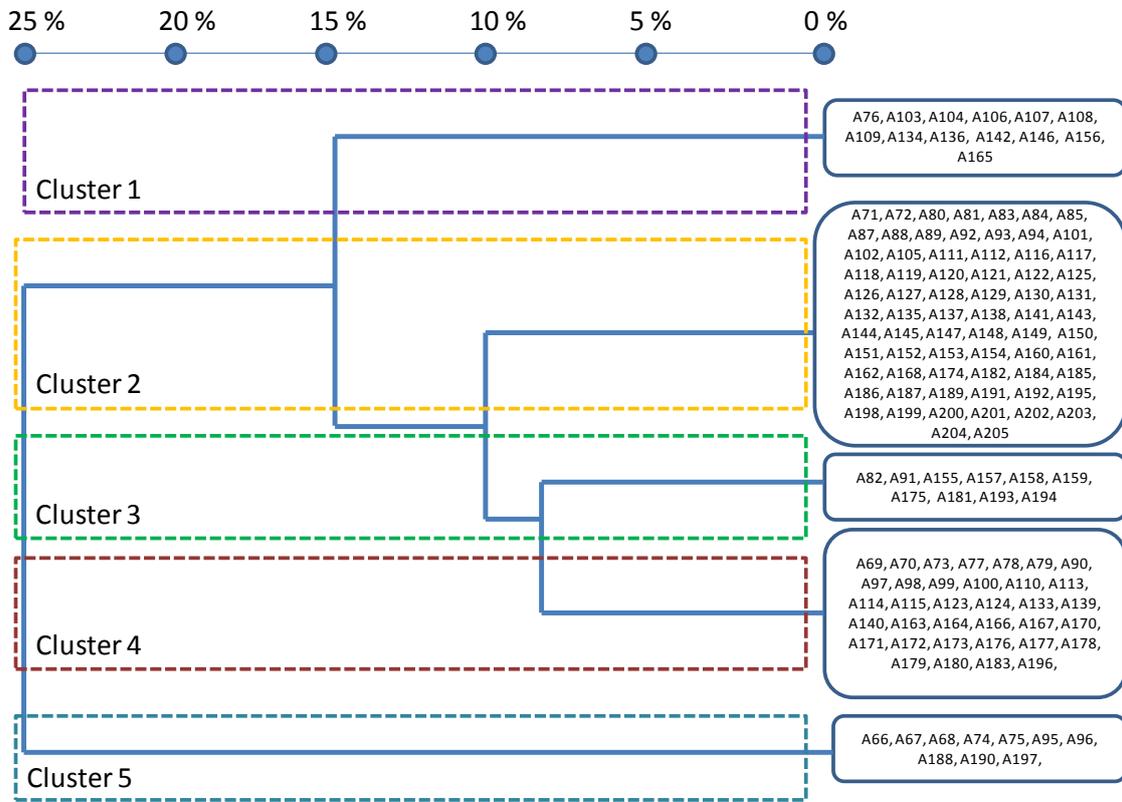
658

659
660

◆ *S. marianum*; ◆ *O. nervosum*; ◆ *C. scolymus*; ◆ *C. humilis*; ◆ *C. cardunculus*

661 Figure 4.

662



663

IV.1.3. Influencia de la preparación y almacenamiento del extracto de *Cynara cardunculus* en su actividad coagulante.

1 **Influencia de la preparación y almacenamiento del extracto de *Cynara cardunculus***
2 **en su actividad coagulante.**

3

4 Elena Ordiales¹, M. José Benito², Alberto Martín², M. Guía Córdoba^{2*}

5

6 ¹ Agricultura, Centro Tecnológico Nacional Agroalimentario Extremadura, CTAEX.
7 Ctra. Villafranco a Balboa, km 1,2. 06195 Villafranco del Guadiana, Badajoz.

8 ² Nutrición y Bromatología. Escuela de Ingenierías Agrarias, Universidad de Extremadura,
9 Ctra. de Cáceres s/n, 06071 Badajoz.

10

11 mdegua@unex.es

12 <http://eia.unex.es/>

13

14

15 **Resumen**

16 En este artículo se recoge la influencia que ejercen diferentes parámetros
17 relacionados con el método de preparación del extracto para su uso como cuajo vegetal
18 en el proceso de elaboración del queso, en una de sus propiedades tecnológicas más
19 relevantes, su actividad coagulante. Se estudian los efectos de la concentración del
20 extracto, el tiempo de maceración en agua, la cantidad del extracto que se añade a la
21 leche, en su capacidad para coagular la leche. Se compara la actividad coagulante de
22 extractos pertenecientes a diferentes muestras de *Cynara cardunculus*, preparados con
23 las mismas variables, y se estudia la influencia del año de recolección de la muestra, el
24 estado de maduración de la flor y la localización. Finalmente se aborda cómo puede
25 influir el almacenamiento del extracto preparado en su actividad coagulante.

26

27 **1. Introducción**

28 La coagulación de la leche por medio de un cuajo es un paso esencial durante la
29 elaboración del queso, y es el resultado de tres fases diferentes pero que se solapan: a) la
30 hidrólisis de κ -caseína da lugar a la desestabilización de las micelas de caseínas, b) la
31 agregación de las micelas de caseínas desestabilizadas, c) la gelificación (Dalglish,
32 1992). Durante la coagulación de las caseínas se forma un gel a modo de matriz, que
33 atrapa o retiene grasa, agua y algunos componentes solubles de la leche.

34 La actividad coagulante ha sido atribuida a la relativamente alta concentración
35 de proteinasas aspárticas, especialmente en los tejidos florales de *Cynara cardunculus*
36 (Barros y Malcata, 2004). La mayor parte de la actividad coagulante que se añade a la
37 leche se pierde en el suero, solo un máximo del 15 % de la actividad coagulante añadida
38 a la leche permanece en la cuajada tras la elaboración, dependiendo de factores como el
39 tipo de coagulante, el ratio de diferentes enzimas en mezclas, la temperatura durante la
40 elaboración, la variedad de queso y el nivel de humedad en el queso final (Guinee y
41 Wilkinson, 1992).

42 Según Irigoyen y col. (2000) la actividad coagulante del cuajo empleado es uno
43 de los factores que tiene mayor importancia en la degradación de las caseínas,
44 similarmente el origen de la enzima coagulante usada (animal, microbiana o vegetal)
45 puede condicionar el nivel de proteólisis, de modo que las enzimas vegetal y
46 microbianas rompen β - caseína más rápido que las enzimas animales.

47 La actividad coagulante está relacionada con la habilidad de la enzima para
48 romper o hidrolizar κ -caseína en la región del péptido Phe₁₀₅-Met₁₀₆, que es específico
49 en el proceso de elaboración del queso. Según los resultados de Campos y col. (1990),
50 el extracto de cardo muestra una especificidad más amplia y ataca varios péptidos
51 unidos, lo que significa que presenta un menor ratio de actividad coagulante
52 relativa/actividad proteolítica. Por tanto, deberían introducirse modificaciones en el pH
53 y la temperatura para mejorar las condiciones de coagulación durante la elaboración de
54 queso.

55 El primer paso de la elaboración del queso es la coagulación de la leche, lo cual
56 implica la unión mediada enzimáticamente de κ -caseína al péptido Phe₁₀₅-Met₁₀₆.
57 Además de esta actividad coagulante, las enzimas del cuajo se quedan atrapadas en la

58 cuajada, donde provocarán la ruptura de proteínas durante la maduración del queso
59 (Dalglish, 1987, Fox, 1989) y por tanto, son las responsables de la liberación de varios
60 péptidos con funciones bioquímicas, reológicas y sensoriales en el queso (Dalglish,
61 1987).

62 La actividad coagulante disminuye cuando aumenta la temperatura de la leche
63 disminuye cuando aumenta el pH de la leche, aumenta al aumentar la concentración
64 enzimática, aumenta con mayores concentraciones de calcio.

65 La actividad coagulante de las cynarasas presentes en las flores de *C.*
66 *cardunculus* sobre la leche, las convierte en enzimas adecuadas para elaborar quesos de
67 pasta blanda, y se asocian con sabores amargos y bajos rendimientos relativamente
68 (Tavaria y col., 2001). Desde el siglo XIX varias metodologías han sido empleadas para
69 caracterizar la actividad coagulante sobre la leche, estando la mayoría de ellas basadas
70 en la observación de la formación de la cuajada sobre un sustrato de leche (Soxhlet,
71 1877; Berridge, 1952). Sin embargo, estos métodos carecen de la definición de la
72 actividad coagulante total (Andrén, 1998), lo cual ha sido adecuadamente solucionado
73 por el IDF Standard 157^a: 1997.

74 Sousa y Malcata (1998) definieron la actividad coagulante en base a Unidades
75 de Coagulación (RU), de modo que una unidad coagulante (RU) se define como la
76 cantidad de extracto necesaria para coagular 10 ml de leche a 30° C durante 100
77 segundos. Por su parte, Chazarra y col. (2007) definieron una unidad de fuerza del cuajo
78 o actividad coagulante (RS) como el número de volúmenes de leche coagulada por cada
79 volumen de cuajo en 40 minutos a 35° C.

80

81 **2. Material y Métodos**

82 *2.1. Material biológico*

83 Para llevar a cabo este estudio se parte de muestras de flores de cardo,
84 pertenecientes a la especie *Cynara cardunculus*. Se recogieron en zonas representativas
85 de Extremadura, donde crecen las plantas de esta especie, en las campañas 2006 a 2009.
86 Las flores se recolectaron entre los meses de junio y julio de cada campaña, en tres
87 estadios de maduración, inicio de floración, plena floración y flor senescente.

88 Las flores recolectadas se separan del involucro en uno de los laboratorios de la
89 Escuela de Ingenierías Agrarias, dejando los estigmas y estilos a secar. Una vez secos,
90 se guardaron las flores de cada muestra por separado, en bolsas de plástico y se
91 mantuvieron en lugar seco, a temperatura ambiente, hasta su utilización.

92 Las muestras de flores de cardo (*C. cardunculus*) empleadas en este estudio se
93 muestran en la Tabla 1.

94

95 *2.2. Preparación de los extractos*

96 Para poner a punto el método descrito por Sousa y Malcata (1998) los extractos
97 de flores de *C. cardunculus* se prepararon a partir de flores secas, picadas y
98 homogeneizadas. Se pesaron 0,5 g de flores y se dejaron macerando en 0,75 ml de agua
99 destilada durante 24 h, a temperatura ambiente. El extracto que se obtiene es filtrado a
100 través de papel de filtro Whatman nº 4, antes de ser usado. La cantidad de extracto
101 acuoso añadido a la leche para la realización de estos ensayos es del 10 % (0,2 ml de
102 extracto en 2 ml de leche), salvo cuando este parámetro sea la variable del ensayo.

103

104 *2.2.1. Concentración de los extractos*

105 Para el desarrollo de este ensayo los extractos acuosos se preparan como se
106 describe anteriormente, cambiando las cantidades de flores secas y picadas de cardo, a
107 macerar en 100 ml de agua destilada. Se ensayaron 6 concentraciones de flores, como se
108 muestra en la Tabla 2. El tiempo de maceración fue de 24 horas, y la muestra de cardo
109 empleada fue la misma (A30).

110

111 *2.2.2. Tiempo de maceración de los extractos*

112 Para evaluar la influencia del tiempo de maceración de los extractos se establece
113 un ensayo, en el que se preparan extractos de dos muestras de cardos, A30 y A49, a tres
114 concentraciones diferentes (P1, P4 y P6: Tabla 2) y se ensayan los tiempos de
115 maceración de 16 h, 4 h, 2 h y 1 h.

116

117 *2.2.3. Cantidad de extracto añadida a la leche*

118 Para diseñar este ensayo se tienen en cuenta las cantidades utilizadas por otros
119 autores y queserías enmarcadas en la DOP Torta del Casar. Las cantidades se extracto a

120 ensayar fueron 0,5 %, 1 %, 3 % y 5 %. La concentración con la que se prepararon los
121 extractos fue P4 (Tabla 2). Se incluyen como variables dos tiempos de maceración para
122 todas las muestras, 30 min y 24 h. Las muestras de cardo empleadas en este caso fueron
123 A30, A206 y A208.

124

125 2.2.4. Comparación entre muestras de *Cynara cardunculus*

126 Con este estudio se compara la actividad coagulante de las muestras de cardo,
127 estudiando la influencia del estado de maduración de la flor, la localización y el año de
128 recolección. Para ello todas las muestras se prepararon bajo las mismas condiciones, a la
129 concentración P4 (5 g flores secas y picadas/100 mL de H₂O), se ensayaron dos tiempos
130 de maceración, 1 h y 24 h, la cantidad de extracto añadida a la leche fue del 3 %.

131

132 2.2.5. Almacenamiento y refrigeración de los extractos

133 Los extractos preparados con la muestra de cardo A30, con las concentraciones
134 P1, P4, P5 y P6 (Tabla 2), macerados durante 24 h, añadidos a la leche a un 3 %, se
135 mantuvieron en condiciones de refrigeración durante 1 y 7 días, tras analizar, recién
136 preparados, su actividad coagulante.

137

138 2.3. Análisis de actividad coagulante

139 La actividad coagulante se determinó según el método estándar (NILACTM;
140 NIZO, Ede, The Netherlands) usando leche descremada en polvo bovina. El sustrato fue
141 preparado disolviendo 12 g de leche en polvo en 100 ml de CaCl₂ 0,01 M (pH 6,5) a 30°
142 C. La leche fue empleada como un sustrato estándar y homogéneo, aunque los extractos
143 de cardo testados se usan sobre leche cruda entera de oveja en la elaboración de los
144 quesos.

145 Se llevaron a cabo varios ensayos enzimáticos, variando las condiciones de
146 preparación de los extractos . En todos los casos el extracto acuoso de cardo se añadió a
147 2 ml de leche reconstituida y el tiempo de actividad coagulante fue determinado
148 visualmente.

149 Una unidad de cuajado (R.U.) se define como la cantidad de extracto acuoso de
150 cuajo que se necesita para cuajar 10 ml de leche descremada reconstituida a 30° C en

151 100 s (FIL-IDF 157/1992). Las determinaciones se realizaron por cuadruplicado y la
152 media de cada cuatro datos se consideró como dato.

153

154 *2.4. Perfiles de proteínas de los extractos*

155 Las proteínas extraídas como se ha descrito anteriormente para su análisis
156 mediante SDS-PAGE se mezclaron con 30 µl de buffer PAGE de carga (62,5 mM Tris-
157 HCl, pH 6,8, 20 % (p/v) glicerol, 2 % (p/v) SDS, 5 % (p/v) β-mercaptoetanol, 0,025 %
158 (p/v) bromofenol azul) y fueron incubadas a 99° C durante 5 min para la
159 desnaturalización de las proteínas. Las condiciones de electroforesis son las descritas
160 por Laemmli (1970), y las concentraciones para la acrilamida (29:1
161 acrilamida/bisacrilamida) en los geles fue de 4 % (p/v) para el gel concentrador, y de 15
162 % (p/v) para el gel separador. Los geles fueron montados y pinchados en un dispositivo
163 Miniprotean III (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA).

164 Para determinar el peso molecular de las distintas fracciones se utilizó un patrón
165 de proteínas constituido por miosina (205 kDa), β-Galactosidasa (116kDa), Fosforilasa
166 B (97 kDa), albúmina (66 kDa), Glutámico deshidrogenasa (55 kDa), ovoalbúmina (45
167 kDa), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (36 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa),
168 tripsinógeno (24 kDa), inhibidor de la tripsina (20 kDa), α-lactoalbúmina (14,2 kDa) y
169 aprotinina (6,5 kDa), suministrado por la casa comercial de SIGMA.

170 El tampón utilizado para la carrera fue Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS al
171 0,1%, pH 8,3. Las electroforesis se realizaron a 100 w los primeros 20 min y a 150 w
172 hasta el final de la carrera. Una vez finalizado el desarrollo electroforético, los geles
173 fueron tratados con una solución de tinción constituida por 0,25 g de azul de Comassie
174 R-250 en una solución 1:1 metanol-agua al 90 % y ácido acético al 10 % durante 15
175 minutos, transcurrido los cuales fueron desteñidos en una solución de metanol al 30 % y
176 ácido acético al 10 %.

177 Se utilizó un programa informático de análisis de imágenes (Genetools,
178 Synoptics Ltd., Cambridge, U.K.) para el análisis densitométrico del gel de
179 electroforesis.

180 2.5. *Actividad proteolítica de los extractos*

181 Los extractos se prepararon como se describe en el apartado 2.2. El sustrato
182 empleado para la degradación por parte de los extractos consistió en una mezcla de
183 caseínas bovinas (Sigma Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA (α , β and κ) a una
184 concentración de 0,5 mg/ml de cada caseína, disueltas en 5 ml de agua destilada. Los
185 extractos de flores secas se maceraron con la mezcla de caseínas, a 2,5 % de extracto
186 (v/v) durante 2 horas, a temperatura ambiente, para permitir la degradación de las
187 caseínas. Después de este tiempo, los extractos junto con las caseínas degradadas fueron
188 desnaturalizados mediante adición de 30 μ l de buffer de carga PAGE (Tris-HCl 6,25
189 mM, pH 6,8, glicerol 20 % (p/v), SDS 2 % (p/v), β -mercaptoetanol 5 % (p/v), azul
190 bromofenol 0,025 % (p/v)) e incubación a 99° C durante 5 min. Las condiciones de
191 electroforesis y el método de análisis empleados se describieron en el apartado 2.4.

192

193 2.6. *Análisis estadísticos*

194 Los análisis estadísticos de los datos fueron llevados a cabo con el programa
195 SPSS para Windows, 15.0. (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Los valores medios de
196 actividad coagulante fueron estudiados mediante análisis de la varianza (ANOVA) de 1
197 vía, y para evaluar si existen diferencias significativas entre los tratamientos ensayados
198 se utilizó el test de Tukey ($P \leq 0,05$).

199

200 **3. Resultados y Discusión**

201 *3.1. Influencia de la concentración del extracto*

202 La Tabla 3 muestra los resultados obtenidos de actividad coagulante para las
203 diferentes concentraciones ensayadas. Se observa que el valor más bajo de actividad
204 coagulante se encontró para la muestra con la concentración P1, la más baja, con valor
205 de actividad coagulante significativamente inferior al resto de concentraciones
206 ensayadas. Por otra parte, la muestra de cardo A30 a la concentración P6, mostró el
207 mayor valor de actividad coagulante, superior significativamente al resto de las
208 concentraciones ensayadas. Por tanto se observa que un extracto preparado a mayor

209 concentración (g flores/ml H₂O), tarda menos tiempo en cuajar la leche, es decir,
210 muestra mayor actividad coagulante.

211 Algunos de estos extractos se sometieron a electroforesis capilar, mediante la
212 técnica SDS-PAGE, para analizar el perfil proteico por un lado, y para estudiar su
213 actividad proteolítica por otro lado.

214 En la Figura 1 se observa que las muestras de extracto preparadas con mayor
215 concentración, presentaron un perfil proteico con bandas con mayor intensidad que las
216 muestras de menor concentración. Igualmente, el efecto de la concentración de extracto
217 se refleja en la actividad proteolítica del extracto sobre las caseínas, de forma que los
218 extractos más concentrados degradaron las caseínas con mayor intensidad.

219

220 *3.2. Influencia del tiempo de maceración del extracto*

221 La Tabla 4 muestra los resultados del ensayo en el que se compara la actividad
222 coagulante de dos extractos, A30 y A49, a tres concentraciones diferentes, en cuatro
223 tiempos de maceración. Para la muestra de cardo A30, a la concentración P1, el mayor
224 valor de actividad coagulante se obtuvo tras 4 horas de maceración, siendo superior
225 significativamente al resto de los tiempos ensayados, mientras que el valor más bajo de
226 actividad coagulante para la concentración P1 se encontró con 2 horas de maceración.
227 Para los extractos preparados a la concentración P4, el mayor valor de actividad
228 coagulante se encontró tras 16 h de maceración, superior significativamente al valor
229 encontrado tras 4 horas de maceración. En cuanto a los extractos preparados a la
230 concentración P6, no se encontraron diferencias significativas para los diferentes
231 tiempos de maceración. Teniendo en cuenta todas las variables, el mayor valor de
232 actividad coagulante para esta muestra de cardo se obtuvo con la concentración P6, tras
233 1 h de maceración, y el menor valor para la concentración P1, tras 2 horas de
234 maceración.

235 Parece que tiene más influencia sobre la actividad coagulante la concentración
236 del extracto que el tiempo de maceración, ya que parece que con alta concentración se
237 obtiene una alta actividad coagulante con menor tiempo de maceración. Para la
238 concentración P4, la actividad coagulante fue la misma con 1, 2 y 4 horas, siendo mayor
239 para 16 h de maceración.

240 Para el extracto preparado con la muestra de cardo A49, para la concentración
241 P1, el mayor valor de actividad coagulante se obtuvo tras 4 horas de maceración,
242 superior significativamente al resto de los tiempos ensayados. El mayor valor de
243 actividad coagulante para la concentración P4 se encontró tras 4 horas de maceración,
244 difiriendo significativamente sólo del valor del extracto preparado tras 2 h de
245 maceración. En cuanto a los extractos a la concentración P6, el valor de actividad
246 coagulante fue mayor para el extracto tras 4 h de maceración, diferente de forma
247 significativa al extracto preparado tras 2 h de maceración. Con este extracto,
248 considerando todas las variables ensayadas, se puede decir que el mayor valor de
249 actividad coagulante se encontró para el extracto preparado con la concentración P6 tras
250 4 h de maceración, mientras que el valor más bajo lo presentaron los extractos de P1,
251 tanto a 1 h, como tras 16 h de maceración. Para las tres concentraciones ensayadas, los
252 mayores valores de actividad coagulante se obtuvieron con los extractos preparados tras
253 4 horas de maceración.

254 A la vista de estos resultados se puede afirmar que con 4 horas de maceración de
255 los extractos sería suficiente para obtener alta actividad coagulante, en lugar de 24 h,
256 con lo que se evitan crecimientos microbianos.

257 A través de la Figura 2 se observa la influencia de la concentración de los
258 extractos en la intensidad de las bandas del perfil, siendo los perfiles con mayor
259 intensidad los que corresponden a los extractos más concentrados (P6). En cambio, no
260 se aprecian diferencias en la intensidad de las bandas en base al tiempo de maceración
261 de los extractos. En cuanto a la actividad proteolítica de estos extractos sobre las
262 caseínas, en la Figura 3 se observa diferente degradación de las caseínas para extractos
263 preparados con diferente concentración, sin encontrar diferencias por el tiempo de
264 maceración.

265

266 *3.3. Influencia de la cantidad de extracto añadida a la leche*

267 En la Tabla 5 se muestran los resultados de la actividad coagulante obtenidos
268 con cuatro cantidades diferentes de extracto que se añade al sustrato de leche, con dos
269 tiempos de maceración, para tres muestras de cardo. Estos extractos se prepararon con
270 la concentración P4 (5 g/100 ml H₂O).

271 Para un mismo tiempo de maceración se observa que a mayor cantidad de
272 extracto añadida, mayor actividad coagulante, con diferencias significativas entre las
273 cantidades de extracto. Esta afirmación se puede aplicar a las tres muestras de cardo y
274 los dos tiempos de maceración. En este caso parece que ejerce más influencia sobre la
275 actividad coagulante la cantidad de extracto añadida a la leche, que el tiempo de
276 maceración del extracto, de forma que la actividad coagulante de los extractos que se
277 añaden a la misma cantidad fue estadísticamente igual entre sí, a pesar de haberse
278 preparado con diferentes tiempos de maceración. Tan solo los extractos añadidos al 5 %
279 de la muestra A208 fueron significativamente diferentes entre sí.

280

281 *3.4. Influencia del estado de maduración de la flor, la localización y el año de* 282 *recolección.*

283 Tras analizar los resultados de actividad coagulante de las muestras de cardo, recogidas
284 en tres años diferentes, tres estados de maduración y varias localizaciones, no se
285 observan diferencias significativas entre los extractos preparados con las muestras para
286 los diferentes años de recolección, los estados de maduración de la flor, ni considerando
287 la localización donde fueron recogidas. Por tanto la actividad coagulante de un extracto
288 no se influenciada por ninguna de estas tres variables, año de recolección, estado de
289 maduración de la flor y localización.

290 En la Figura 5 se muestra el perfil proteico de 4 muestras de extracto, preparadas
291 con la misma concentración, P4 (5 g/100 ml H₂O), y el mismo tiempo de maceración, 1
292 hora. Se observa que las diferentes muestras presentan el mismo perfil en cuanto a
293 bandas se refiere, pero no en la intensidad de dichas bandas. Estas diferencias en la
294 intensidad de las bandas de los perfiles proteicos se traducen en diferente actividad
295 proteolítica sobre las caseínas, de modo que los perfiles con bandas más intensas, fueron
296 los más proteolíticos.

297

298 *3.5. Influencia del almacenamiento y refrigeración del extracto*

299 Tras mantener los extractos acuosos de la muestra A30 (P1, P4, P5 y P6) en
300 refrigeración durante 1 día y 7 días, se analizó la actividad coagulante y se comparó con

301 la actividad coagulante obtenida con el extracto recién preparado. Los resultados se
302 muestran en la Tabla 8.

303 Para la concentración P1, la actividad coagulante de los extractos fue
304 significativamente inferior tras 1 día en refrigeración, respecto al extracto recién
305 preparado y tras 7 días refrigerado. Sin embargo, para la concentración P5, el extracto
306 que mostró mayor actividad coagulante fue el que estuvo 1 día refrigerado, diferente
307 significativamente al resto, mientras que la actividad coagulante más baja se encontró
308 para el extracto recién preparado. Con las concentraciones del extracto, P4 y P6, se
309 observa que la actividad coagulante del extracto aumenta con el tiempo de refrigeración,
310 existiendo diferencias significativas entre los extractos.

311 Por tanto parece que la actividad coagulante de los extractos no se reduce al
312 mantenerlos en refrigeración al menos durante 7 días, pudiendo observar incluso un
313 incremento en la actividad coagulante.

314 Távaira y col. (2001) estudiaron los efectos del almacenamiento y liofilización
315 de los extractos de *Cynara cardunculus* en la degradación de caseínas ovinas y caprinas.
316 Observaron que la actividad coagulante tiende a disminuir con el tiempo de
317 almacenamiento, de forma que extractos frescos, almacenados a 4° C mostraron una
318 disminución del 65 % de su actividad coagulante tras 4 semanas, con una pérdida del 22
319 % en la segunda semana. Afirman que la actividad proteolítica sobre α - y β -caseína
320 aumentaba tras 1 semana en refrigeración y disminuía entre la semana 1 y 2 de
321 almacenamiento.

322

323 **Referencias**

324 Barros, R.M. y Malcata, F.X. (2004). *A kinetic model for hydrolysis of whey proteins by*
325 *cardosin A extracted from Cynara cardunculus*. Food Chemistry, 88, 351-359.

326 Campos, R., Guerra, R., Aguiar, M., Ventura, O., y Camacho L. (1990). *Chemical*
327 *characterization of proteases extracted from wild thistle (Cynara cardunculus)*.
328 Food Chem. 35, 89-97.

329 Chazarra, S., Sidrach, L., López-Molina, D., Rodríguez-López, J.N. (2007).
330 *Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke*
331 *(Cynara scolymus, L.) flowers*. International Dairy Journal, 17, 1393-1400.

332 Dalglish, D. E. (1987). *The enzymatic coagulation of milk*. In Cheese: Chemistry,
333 Physics and Microbiology, Vol. 1. (Ed. P. F. Fox). Elsevier Applied Science
334 Publishers, London, pp. 63-96.

335 Dalglish, D. G. (1992). *The enzymatic coagulation of milk*. In P. F. Fox (Ed.), Advanced
336 dairy chemistry. Proteins (Vol. 1, pp.579-619). London: Elsevier.

337 Fox, P.F. (1989). *Proteolysis during cheese manufacture and ripening*. J. Dairy Sci. 72,
338 1379-1400.

339 Guinee, T. M. y Wilkinson, M. G. (1992). *Rennet coagulation and coagulants in cheese*
340 *manufacture*. Journal of the Society of Dairy Technology, 45, 94-104.

341 Irigoyen, A., Izco, J. M., Ibáñez, F. C. y Torre, P. (2000). *Evaluation of the effect of*
342 *rennet type on casein proteolysis in an ovine milk cheese by means of capillary*
343 *electrophoresis*.

344 Sousa, M. J. y Malcata, F. X. (1998). *Proteolysis of ovine and caprine caseins in*
345 *solution by enzymatic extracts of Cynara cardunculus cheese*. Enzyme
346 Microbiology and Technology, 22, 305-314. Journal of Chromatography A, 881,
347 59-67.

348 Tavaría F.K., Sousa, M.J., and Malcata, F.X. (2001). *Storage and lyophilization effects*
349 *of extracts of Cyanra cardunculus on the degradation of ovine and caprine*
350 *caseins*. Food chemistry, 72, 79 – 88.

351

352

353

354 Figura 25. Perfil proteico y actividad proteolítica sobre caseínas de tres muestras de
355 extracto preparados a partir de la muestra A30, a diferentes concentraciones.

356 Figura 26. Perfiles proteicos de extractos de las muestras de cardos A49 y A30,
357 preparados a dos concentraciones diferentes, P4 y P6, y con dos tiempos de maceración
358 diferentes, 1 y 2 horas.

359 Figura 27. Actividad proteolítica de extractos de las muestras de cardos A49 y A30,
360 preparados a dos concentraciones diferentes, P4 y P6, y con dos tiempos de maceración
361 diferentes, 1 y 2 horas.

362 Figura 28. Actividad coagulante del extracto preparado con las muestras A30, A206 y
363 A208 con diferentes cantidades y tiempos de maceración.

364 Figura 5. Perfil proteico y actividad proteolítica de extractos de diferentes muestras de
365 cardo, preparados a la misma concentración y mismo tiempo de maceración.

366

Tabla 1. Identificación de las muestras de *Cynara cardunculus* empleadas en este estudio.

Código	Año	Estado maduración	Localización
A23	2006	b	Puebla de la Calzada
A27	2006	b	Berlanga
A28	2006	b	Berlanga
A30	2006	b	Sancha Brava
A31	2006	b	Sancha Brava
A36	2006	b	Montijo - La Nava de S.
A38	2006	b	La Albuera
A40	2006	b	Sta. Marta - Solana
A42	2006	b	Cruce de Montijo
A35	2006	b	Montijo - La Nava de S.
A44	2006	b	Mérida - Madrid, km 300
A45	2006	b	Mérida - Madrid, km 300
A46	2006	b	Mérida - Madrid, km 300
A48	2006	b	Mérida - Madrid, km 300
A49	2006	b	Mérida - Madrid, km 300
A50	2006	b	Mérida - Madrid, km 300
A51	2006	b	Mérida - Madrid, km 300
A52	2006	b	Mérida - Madrid, km 300
A83	2007	a	Sancha Brava
A84	2007	b	Sancha Brava
A85	2007	c	Sancha Brava
A86	2007	a	Sancha Brava
A87	2007	b	Sancha Brava
A88	2007	c	Sancha Brava
A92	2007	a	Sancha Brava
A93	2007	b	Sancha Brava
A94	2007	c	Sancha Brava
A126	2007	b	Ctra. Mérida - Madrid
A129	2007	b	Ctra. Mérida - Madrid
A116	2007	a	Cruce de Montijo (Ctra. CC)
A117	2007	b	Cruce de Montijo (Ctra. CC)
A118	2007	c	Cruce de Montijo (Ctra. CC)
A119	2007	a	Cruce de Montijo (Ctra. CC)
A120	2007	b	Cruce de Montijo (Ctra. CC)
A121	2007	c	Cruce de Montijo (Ctra. CC)
A122	2007	c	Cruce de Montijo (Ctra. CC)
A206	2007	b	DO Torta del Casar
A141	2008	b	Quesería El Castúo, Cáceres
A142	2008	b	Quesería El Castúo, Cáceres
A147	2008	b	Finca La Orden, Guadajira
A148	2008	c	Finca La Orden, Guadajira
A169	2008	b	Mérida. Autovia A-V. Cáceres.
A170	2008	c	Mérida. Autovia A-V. Cáceres.

368 Tabla 15. Concentraciones de flores de cardo en agua empleadas para la preparación de los
 369 extractos

Código	Flores secas picadas (g)/100 mL H ₂ O
P1	0,65
P2	1,5
P3	2,5
P4	5
P5	7
P6	10

370

371 Tabla 16. Actividad coagulante de las muestras de cardo A30, a diferentes concentraciones.

Muestra	Concentración	Actividad coagulante (R.U./ml)
P1	0,65 g/100 ml H ₂ O	0,065 ± 0,005 ^a
P2	1,5 g/100 ml H ₂ O	0,132 ± 0,003 ^b
P3	2,5 g/100 ml H ₂ O	0,208 ± 0,036 ^c
P4	5 g/100 ml H ₂ O	0,300 ± 0,003 ^d
P5	7 g/100 ml H ₂ O	0,377 ± 0,017 ^e
P6	10 g/100 ml H ₂ O	0,604 ± 0,060 ^f

372 ^a Valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente (P<0,05).

373

374

375

376

377

378

379 Tabla 17. Actividad coagulante de dos muestras de cardo, a tres concentraciones diferentes, y
 380 con cuatro tiempos de maceración.

381

Tiempo maceración (h)	A30			A49		
	P1	P4	P6	P1	P4	P6
1	0,059	0,490	1,627	0,044	0,366	1,627
	± 0 ^b	± 0,004 ^{ab}	± 0,050 ^a	± 0,003 ^a	± 0,052 ^{ab}	± 0,050 ^{ab}
2	0,051	0,485	1,511	0,054	0,285	0,570
	± 0,001 ^a	± 0,007 ^{ab}	± 0,058 ^a	± 0 ^b	± 0,002 ^a	± 0,014 ^a
4	0,083	0,467	1,054	0,075	0,480	1,992
	± 0 ^d	± 0,025 ^a	± 0,139 ^a	± 0,001 ^c	± 0,080 ^b	± 0,069 ^b
16	0,061	0,588	0,885	0,045	0,441	0,920
	± 0,002 ^c	± 0,006 ^b	± 0,009 ^a	± 0,001 ^a	± 0,079 ^{ab}	± 0,008 ^{ab}

382 ^a Valores en la misma columna seguidos de la misma letra no difieren
 383 significativamente (P<0,05).

384

385 Tabla 18. Actividad coagulante (R.U./ml) de tres muestras de cardo diferentes, con dos tiempos
 386 de maceración distintos, y cuatro cantidades de extracto.

Tiempo maceración (h)	Cantidad (%)	A30	A206	A208
24	0,5	0,032 ± 0,004 ^a	0,041 ± 0,002 ^a	0,041 ± 0,003 ^a
	1	0,061 ± 0,008 ^a	0,048 ± 0,012 ^a	0,064 ± 0,004 ^b
	3	0,239 ± 0,083 ^{bc}	0,189 ± 0,136 ^{ab}	0,135 ± 0,018 ^c
	5	0,247 ± 0,043 ^{bc}	0,296 ± 0,187 ^b	0,180 ± 0,002 ^d
0,5	0,5	0,030 ± 0,003 ^a	0,029 ± 0,002 ^a	0,044 ± 0,016 ^a
	1	0,057 ± 0,015 ^a	0,041 ± 0,004 ^a	0,050 ± 0,003 ^{ab}
	3	0,182 ± 0,001 ^b	0,174 ± 0,002 ^{ab}	0,120 ± 0 ^c
	5	0,284 ± 0,002 ^c	0,283 ± 0,002 ^b	0,213 ± 0,001 ^e

387 ^a Valores en una misma columna, seguidos por la misma letra no difieren
 388 significativamente (P<0,05).

389

390

391 Tabla 19. Actividad coagulante de los extractos recogidos en los diferentes años y en los
 392 distintos estados de maduración de la flor.

Año	RU/ml	Estado maduración	RU/ml
2006	0,153 ± 0,038	a	0,175 ± 0,032
2007	0,183 ± 0,061	b	0,165 ± 0,056
2008	0,162 ± 0,046	c	0,162 ± 0,038

393

394

395

396

397

398

399 Tabla 20. Actividad coagulante de los extractos recogidos en diferentes localizaciones.

Localización	RU/ml
Sancha Brava	0,200 ± 0,060
Cáceres	0,193 ± 0,039
Balboa –Talavera	0,150 ± 0,022
Ctra. Madrid - Mérida	0,141 ± 0,039
La Albuera	0,162 ± 0,036
La Orden - Guadajira	0,195 ± 0,069
Cruce Montijo	0,181 ± 0,059
Berlanga	0,171 ± 0,027
Montijo – La Nava S.	0,138 ± 0,068

400

401 Tabla 21. Actividad coagulante de extractos sin refrigerar y tras refrigeración durante 1 y 7 días.

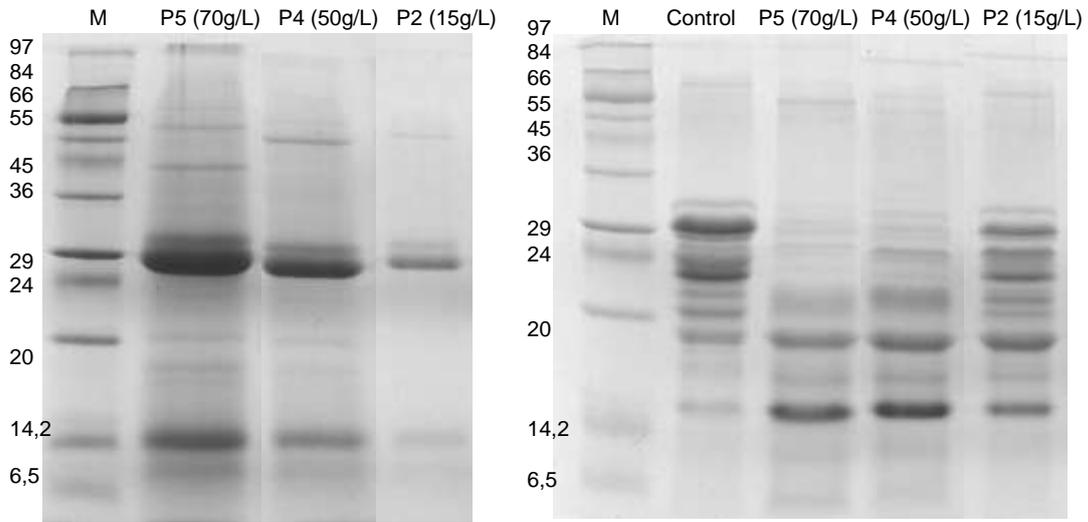
C2006	Recién preparado (R.U./ml)	1 día en refrigeración (R.U./ml)	7 días en refrigeración (R.U./ml)
P1	0,065 ± 0,005 b	0,050 ± 0,005 a	0,062 ± 0 b
P4	0,300 ± 0,003 a	0,721 ± 0,005 b	0,851 ± 0,014 c
P5	0,377 ± 0,017 a	1,516 ± 0,037 c	0,711 ± 0,015 b
P6	0,604 ± 0,060 a	0,903 ± 0,018 b	1,311 ± 0,118 c

402 ^a Valores en una misma fila, seguidos por la misma letra no difieren significativamente
 403 (P<0,05).

404

405

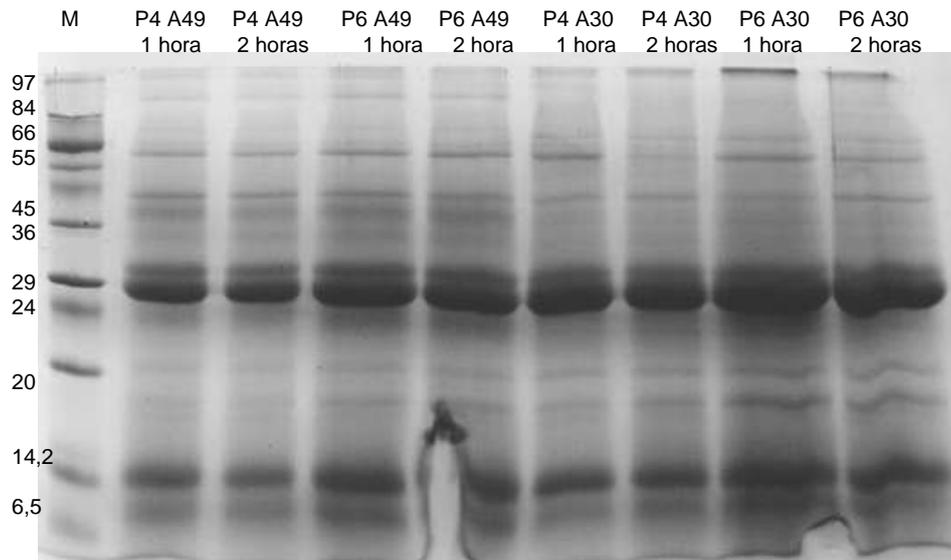
406 Figura 1.



407

408

409 Figura 2.



410

411

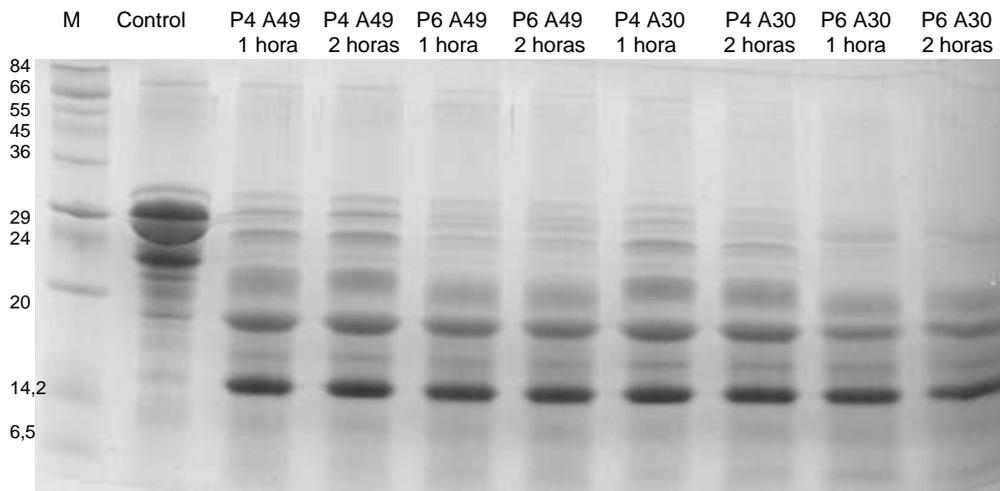
412

413

414

415

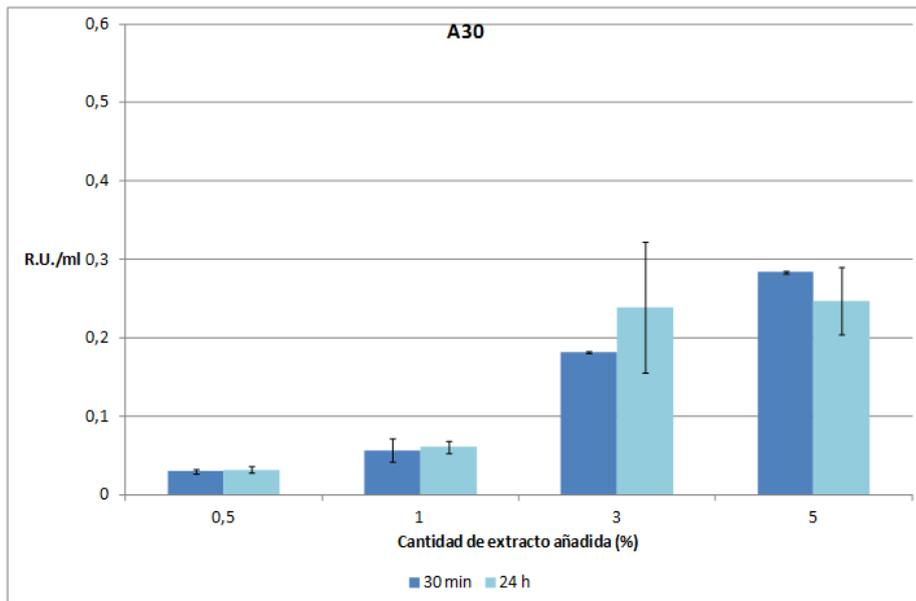
416 Figura 3.



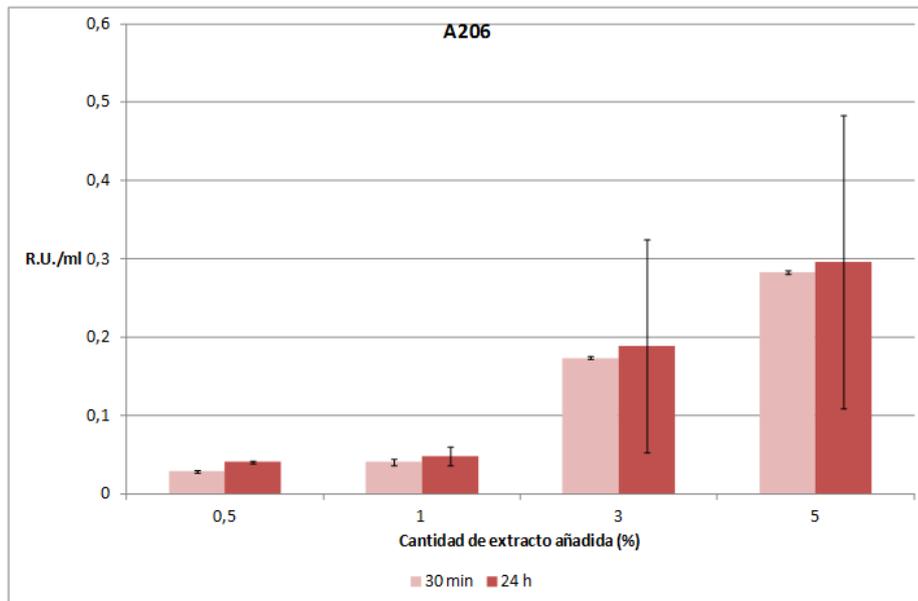
417

418 Figura 4.

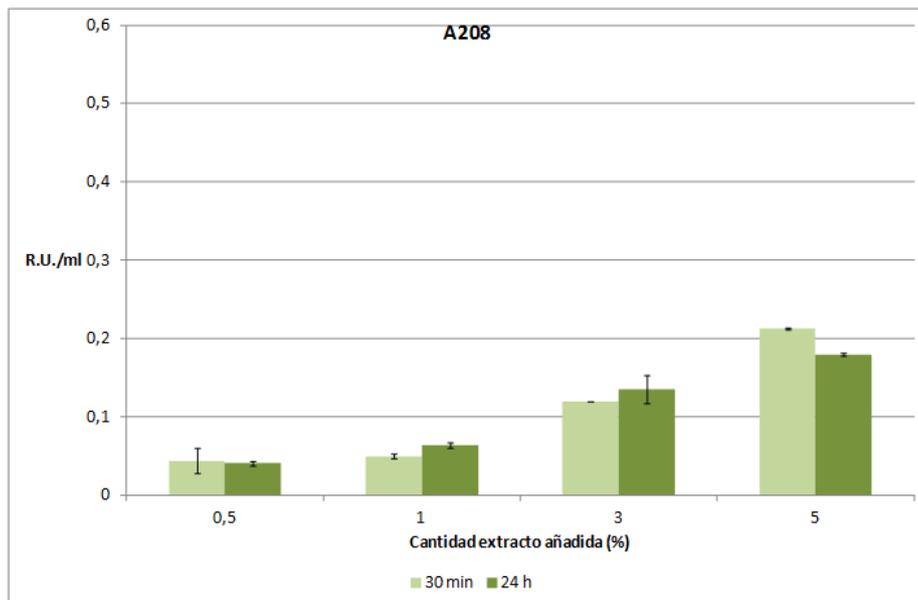
419



420
421

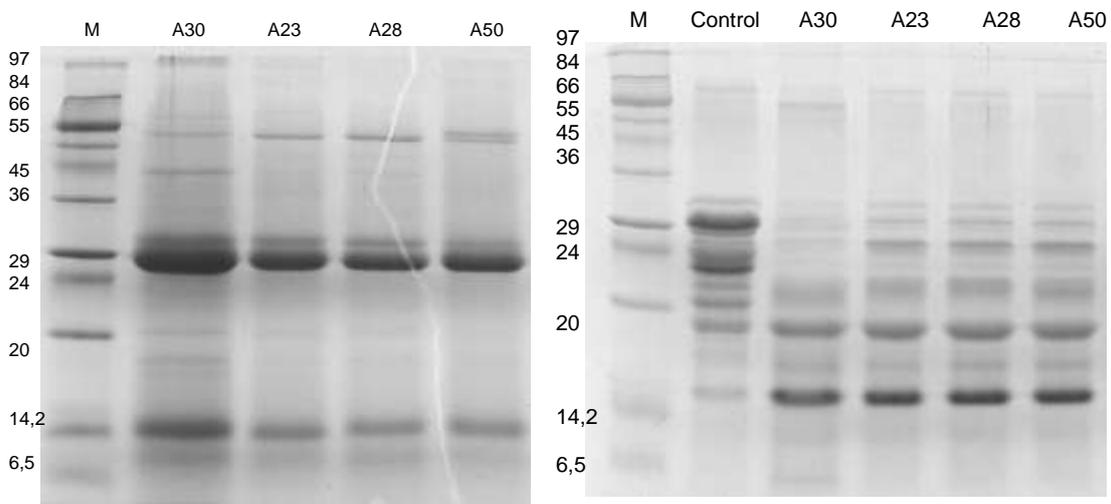


422
423



424
425
426

427 Figura 5.
428



429

430

431

432

IV.2. CAPÍTULO II

En este capítulo, que aborda el objetivo 2 de este trabajo, se estudia la influencia de los diferentes años de recolección, y los estados de maduración de la flor de *Cynara cardunculus*, en el momento de su recolección, sobre las características sensoriales de los quesos elaborados. Para llevar a cabo este estudio se emplearon técnicas basadas en perfiles de proteínas. Se elaboraron quesos tipo “Torta del Casar” con 16 muestras de cardo (*C. cardunculus*) seleccionadas por sus características tecnológicas. Este capítulo consta del artículo:

IV.2.1. Technological characterisation by free zone capillary electrophoresis (FZCE) of the vegetable rennet (*Cynara cardunculus*) used in “Torta del Casar” cheese-making

Food Chemistry, 133, 227-235



Analytical Methods

Technological characterisation by free zone capillary electrophoresis (FCZE) of the vegetable rennet (*Cynara cardunculus*) used in “Torta del Casar” cheese-making

Elena Ordiales^b, Alberto Martín^{a,*}, María José Benito^a, Alejandro Hernández^a, Santiago Ruiz-Moyano^a, María de Guía Córdoba^a

^a Nutrición y Bromatología, Escuela de Ingenierías Agrarias, Universidad de Extremadura, Ctra. de Cáceres s/n, 06071 Badajoz, Spain

^b Agricultura, Centro Tecnológico Agroalimentario Extremadura (CTAEX), Ctra. Villafranco a Balboa Km. 1,2, Villafranco del Guadiana, 06080 Badajoz, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 August 2011

Received in revised form 2 December 2011

Accepted 10 January 2012

Available online 17 January 2012

Keywords:

Cynara cardunculus

Technological characterisation

Protein profile

FCZE

Cheese

ABSTRACT

The purpose of this work was to develop a procedure based on protein analysis by free zone capillary electrophoresis (FZCE) that can be used as an alternative to other methods in the determination of the technological quality of vegetable rennet to use in “Torta del Casar” cheese-making. Samples of cardoon flowers (*Cynara cardunculus*) grouped according to location, harvest year, and ripening stages were used in the study. For the FZCE, a protocol for extracting the methanol-soluble proteins was tested. This method was found to give good repeatability of the corrected migration time (CMT), and showed higher effectiveness in discriminating the technological properties (milk-clotting and casein degradation activities) of vegetal rennets than the SDS–PAGE technique. In addition, three peaks found in the FZCE electropherograms were examined as a good tool to predict the impact of vegetable rennet on the creaminess and overall acceptability of the “Torta del Casar” cheese.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

“Torta del Casar” is a high quality Spanish cheese marketed under the Registry of the Protected Designation of Origin “Torta del Casar” (Casar de Cáceres, Cáceres, Spain) in accordance with the Regulation (CE) (1491/2003) of the European Commission. This cheese is produced in the Extremadura region, in the south-west of Spain, and it is characterised by its soft and buttery texture, yellowish-coloured paste, intense flavour, and its peculiar, slightly bitter taste. It is made from whole raw ewe’s milk by enzymatic clotting using as coagulant an aqueous extract of dried wild cardoon (*Cynara cardunculus*) flowers (Macedo, Faro, & Pires, 1993).

Aqueous extracts of cardoon flowers have been used for centuries as rennets in traditional ewe’s milk cheesemaking in the Iberian Peninsula (Roseiro, Barbosa, Ames, & Wilbey, 2003). Flowers of *C. cardunculus* contain aspartic proteinases named cardosins or cynarases (Brodelius, Cordeiro, & Pais, 1995; Heimgartner et al., 1990; Silva & Malcata, 1999). These enzymes are similar, in terms of specificity and activity, to chymosin and pepsin (Pires et al., 1994; Veríssimo, Esteves, Faro, & Pires, 1995), although the proteolytic activity of cynarases appears to be less specific than chymo-

sin. This aspect is suited to the manufacture of soft-bodied cheeses often associated with bitter tastes and relatively low yields, such as “Torta del Casar” (Tavaria, Sousa, & Malcata, 2001).

However, traditional aqueous extracts are made from flowers of diverse *C. cardunculus* varieties harvested at different flower ripening stages and mixed with other parts of the plant. In addition, the milk clotting activity of the flowers shows great variability mainly related to the drying conditions (Martins, Vasconcelos, & Sousa, 1996). This great heterogeneity of the rennet used in “Torta del Casar” manufacture has a negative influence on the cheese quality parameters, including low yield, lack of homogeneity of relevant sensorial factors between batches, etc., that it can lead to significant economic losses. Thus, the development of a method for the quality control of the aqueous extracts used as rennet would be desirable for standardisation of the cheese-making process.

A protein profile study is suitable for this purpose. Various works have described methods based on protein patterns to control food quality (Bietz, 1994; Cancalon, 1995; Hernández, Martín, Aranda, Bartolomé, & Córdoba, 2007; Serradilla et al., 2008). Analyses of proteins in these complex mixtures are presently performed mainly by sodium dodecylsulfate (SDS)–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) and reversed-phase high performance liquid chromatography (RP–HPLC). However, this technique involves many manual steps, including gel preparation in gel molds, setting the gel molds in an electrophoresis apparatus,

* Corresponding author. Tel.: +34 924 286200; fax: +34 924 286201.

E-mail address: amartin@unex.es (A. Martín).

URL: <http://eia.unex.es> (A. Martín).

sample injection, removal of gels from the molds, staining and destaining of the gels, etc. (Bietz, 1994). To quantify the stained proteins, further manual steps are required for the densitometry or image analysis of the stained gel. Capillary electrophoresis (CE) may be used as an alternative method since it offers several advantages over SDS–PAGE, such as more rapid analysis, detection, on-column quantification, and increased efficiency and resolution (Cancalon, 1995; Manabe, 1999). In addition, CE methods involve a simple extraction of proteins and small quantities of organic solvents in comparison with RP–HPLC. A subset of CE called free zone capillary electrophoresis (FZCE) has been applied to the analysis of complex protein systems. In the last decade, CE has proved to be an efficient separation technique for the analysis of food proteins in general (Recio, Ramos, & López-Fandiño, 2001) and milk proteins in particular (Recio, Amigo, & López-Fandiño, 1997). In fact, CE has been applied to monitoring proteolysis in cheese (Otte, Ardö, Weimer, & Sorensen, 1999), mainly in bovine cheese, but also in ewe and goat cheeses (Cattaneo, Nigro, Toppino, & Denti, 1996). Moreover this technique has been used to study the proteolysis of cheese produced with *Cynara L.* as coagulant (Roseiro, Gómez-Ruiz, García-Risco, & Molina, 2003). Thus, FZCE might be useful for the quality control of the extract used as rennet in “Torta del Casar” manufacture.

The aim of this work was to develop a procedure based on protein profile analysis that can be used to control the technological quality of aqueous extracts used as rennet in “Torta del Casar” manufacture.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and rennet extract preparation

Samples of cardoon (*C. cardunculus*, L.) used in this study were identified previously in accordance with the guidelines of Valdés, Talavera, and Fernández-Galiano (1987). They were collected from six locations during the seasons of the years 2007 and 2008, and grouped into 3 different ripening stages in accordance with the cardoon flower's phenological characteristics (Table 1), ripening stage a (flowers opening, only some styles, and stigmas are visible), b (flowers fully open, even with pollen) and c (flowers begin to dry, so they are brownish, instead of violet colour). The collected flowers were dried and kept in a cool dry place until use.

Table 1
Sample information of cardoon flowers used to prepare the vegetable rennets.

Sample	Maturation stage ^A	Year	Localization ^B
M1	b	2007	L2 Ctra. Mérida – Madrid
M2	a	2007	L3 La Albuera
M3	b	2007	L2 Ctra. Mérida – Madrid
M4	c	2007	L6 Sancha Brava
M5	b	2008	L4 Mérida. Autovía A-V. Cáceres
M6	c	2007	L6 Sancha Brava
M7	b	2008	L1 Canal de Balboa
M8	c	2007	L6 Sancha Brava
M9	c	2007	L3 La Albuera
M10	c	2008	L1 Canal de Balboa
M11	c	2007	L3 La Albuera
M12	a	2007	L3 La Albuera
M13	c	2007	L5 Puebla de la Calzada
M14	b	2008	L4 Mérida. Autovía A-V. Cáceres.
M15	a	2007	L3 La Albuera
M16	b	2008	L4 Mérida. Autovía A-V. Cáceres.

^A a, flower is opening, only some styles and stigmas are visible; b, flower fully open, even with pollen; c, flower begins to dry, so some styles and stigmas are brownish.

^B Geographic coordinates: L1: 38°54'8,82"N 6°43'59,9"W, L2: 38°50'34,8"N 6°57'39,73"W, L3: 38°45'6,73"N 6°48'10,42"W, L4: 38°57'0,30"N 6°16'53,03"W, L5: 38°53'59,94"N 6°51'12,43"W, L6: 38°56'32,78"N 6°20'23,16"W, L7: 38°54'23,54"N 6°47'37"W.

2.2. Milk-clotting activity assay

For milk-clotting assays, 0.5 g of each cardoon sample was softened in 75 mL of ultrapure water for 1 and 24 h. The rennet clotting time of these coagulant extracts was measured according to a standard method (NILAC™; NIZO, Ede, The Netherlands) described by Tavaría et al. (2001). The substrate was prepared by dissolving 12 g of low-heat bovine skimmed milk powder in 100 mL of 0.01 M CaCl₂ (pH 6.5) at 30 °C. The enzymatic assay was performed using 0.2 mL of coagulant extract added to 2 mL of reconstituted skim milk, and the clotting time was determined by visual inspection. One rennet unit (R.U.) was defined as the amount of crude enzyme extract needed to coagulate 10 mL of reconstituted low-heat processed skim milk at 30 °C in 100 s (FIL-IDF 157/1992). Determinations were quadruplicated, and the mean of each set of four data was taken as the datum point.

2.3. “In vitro” casein proteolytic activity

The dried flower extracts were prepared by macerating 0.25 g of dried flowers in 5 mL of water (corresponding to a proportion of 50 g in 1 L) at room temperature for 4 h. The homogenate was filtered through a Whatman filter paper No. 4. The substrate used for degradation by the extracts consisted of a mix of bovine caseins (Sigma Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) (α , β , and κ), at a concentration of 0.5 mg/mL of each casein, dissolved in 5 mL of distilled water. The dried flower extracts were macerated with the casein mix, at 2.5% of extract (v/v), for 2 h at room temperature to allow casein degradation. After this time the extracts with degraded caseins were denatured by adding 30 μ L of SDS–PAGE loading buffer (62.5 mM Tris–HCl, pH 6.8, 20% (w/v) glycerol, 2% (w/v) SDS, 5% (w/v) β -mercaptoethanol, 0.025% (w/v) bromophenol blue) and incubated at 99 °C for 5 min.

The electrophoresis conditions were those described by Laemmli (1970), and the concentrations of acrylamide (29:1 acrylamide/bisacrylamide) in the gels were 4% (w/v) for stacking gels and 15% (w/v) for separating gels. Gels were cast and run in a Minipro-tean III device (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). The molecular mass marker kits (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) contained proteins from 6.5 to 205 kDa. The gels were subsequently stained with 0.5% (w/v) Coomassie blue (G-250) dissolved in 45% (v/v) water, 45% (v/v) methanol, and 10% (v/v) acetic acid for 30 min, and destained with a solution consisting of 20% (v/v) methanol, 10% (v/v) acetic acid, and 70% (v/v) distilled water for 4 h. A computer image analysis program (Genetools, Synoptics Ltd., Cambridge, UK) was used for the densitometric analysis of the gel electrophoreses.

2.4. Extraction of proteins from coagulant extracts for SDS–PAGE and CE analysis

For SDS–PAGE analysis, the proteins were directly extracted after a filtering step from the same coagulant extracts used for *in vitro* casein proteolytic activity assays. Direct extraction of cardoon samples with water may lead to components other than proteins being removed, and the consequent poor resolution of the FZCE. In particular, plant extracts may also contain compounds such as polysaccharides, polyphenols, anthocyanin, tannins, DNA, free amino acids, and sugars that could potentially bind to the inner walls of the silica capillaries (Bean & Lookhart, 2001). Hence, a pre-extraction step was included, mixing 1 g of cardoon with methanol (3:10 w/v) for 5 min at room temperature. Longer extraction times did not improve the effectiveness of the extraction. The suspension vortexed periodically, centrifuged at 5800g for 5 min, and the supernatant was collected. From an aliquot of 0.5 mL, methanol-soluble proteins were partially precipitated (except for the most of the apolar protein fraction) with chloroform

(1:2 v/v) and centrifuged at 24,000g for 5 min. The pellets were cleansed twice with chloroform, and the pigment-free pellets were collected and then suspended in 100 μ L of 30% (v/v) acetonitrile according to the protocol described by Hernández, Martín, Aranda, Bartolomé, and Córdoba (2006).

Cardosins standards have been purified from *C. cardunculus* flowers according to Sidrach, García-Canovás, Tudela, and Rodríguez-López (2005) with some modification. Stigmas (100 g) were ground in a food mixer and homogenised in 800 mL 50 mM aqueous citrate buffer (pH 3.0), containing 1 M NaCl to prevent non-specific proteinase binding to the filter membrane in the following ultrafiltration step. The ground homogenate was filter through muslin to remove most of the solid residue. After centrifugation of the homogenate at 24,000 rpm for 20 min, the supernatant was filtered through a Whatman filter paper No. 4. The resulting solution constituted the crude extract, which was concentrated and dialysed by ultrafiltration (Pellicon XL PXB010A50, Millipore) against 25 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6. This concentrated solution was directly loaded in a Q-Sepharose Fast Flow column equilibrated with 25 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6 coupled to FPLC system equipped with a UV detector at 214 nm and a fraction collector FRAC-950 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). After sample application, the enzymes were displaced with step gradients of 0.30, 0.35, and 0.5 M NaCl in the previous buffer. The fractions that contain the cardosins were collected. Before FZCE analysis, cardosin fractions were concentrated and dialysed by ultrafiltration (Pellicon-2 PLCGC10, Millipore Corp.) against ultrapure water.

2.5. SDS-PAGE and FZCE analysis of coagulant extract proteins

The SDS-PAGE analysis of the rennet extract proteins was performed under the above conditions for the casein proteolytic activity determination. For the FZCE analysis, the protein extracts were previously filtered through a 0.2 μ m filter. The separations were done on an automated PACE 5500 device (Beckman Instrument, Inc., Palo Alto, CA, USA). To minimise the interaction of proteins with the column wall, basic pH values were chosen to make the run buffer. Run buffer was prepared with HPLC-grade water obtained from a Milli-Q water purification system, and consisted of 20.6 mM tetraborate, 8.75 mM phosphate at a nominal pH of 9 with 20% of acetonitrile. Uncoated fused silica capillaries of 75 μ m i.d. and 57 cm total length (50 cm to window detector) were used (Supelco, Tecknocroma, Barcelona, Spain). The capillary was initially conditioned with 100 mM NaOH for 10 min, and then with de-ionised water for 5 min. They were rinsed between separations for 2 min with 20 mM NaOH, for 2 min with de-ionised water, and then with separation buffer for 2 min. When not in use, the capillaries were rinsed with 100 mM NaOH for 10 min, followed by water for 10 min, and finally dried by nitrogen gas for 10 min. The separation voltage was 263 V/cm (15 kV) and the separation temperature was 23 °C. The wavelength used to monitor the assays was 214 nm. Samples were injected under pressure (0.5 psi) for 5 s and the protein spectra were monitored from 190 to 300 nm with a PACE diode array detector (Beckman Instrument Inc., Palo Alto, CA, USA). For the determination of the analytical parameters, a negative acetonitrile peak visualised at 254 nm was used to normalise peak areas and to calculate the corrected migration times (CMTs) of the peaks. For comparison of CZE profiles, protein peaks were characterised using corrected migration times and UV absorbance spectra. The Beckman P/ACE Station (Version 1.21) software package was used to store, manipulate, and compare the electropherograms.

2.6. "Torta del Casar" cheese-making procedure

A total of 16 different batches of "Torta del Casar" were manufactured, of 10 cheeses each batch, from unpasteurised Merino

ewe's milk to which no starter cultured was added. Each batch was clotted using a *C. cardunculus* L. rennet, corresponding to the samples listed in Table 1. The aqueous extracts from the cardoon *C. cardunculus* L. were prepared from 50 g of dried flowers in 1 L of water, leaving them to macerate for 24 h, and adding 10 mL of this extract per litre of milk at 28–30 °C, for each 32 L batch. After pressing, the cheeses were immersed in a salt solution (16% (w/v) NaCl) for 4 h. The ripening took place at a temperature of 5–10 °C and relative humidity of 85–90% throughout the ripening period of 60 days. Three cheeses of each batch were randomly taken for analysis after 60 days of ripening.

2.7. Sensory evaluation

Eighteen panelists previously selected and trained under ISO standards (UNE-ISO 4121-2006) with samples of "Torta del Casar" were asked to characterise the sensory quality of the batches selected according to the protein profile of the cardoon used for the clotting stage. The cheeses were cut into slices of approximately 5 mm thickness. The slices were equilibrated for 30 min at room temperature before serving. Descriptive analyses were made according to international standard methods. Twenty-four parameters related to colour, appearance, texture, taste, odour, and flavour were assessed using a structured line scale with intensity descriptors at the end points (1, low; 10, high). Samples were three-digit coded and the order of serving was determined by random permutation. Two panel replicates were carried out on each sample. The response to each indicator was taken as the mean of the panelists' responses. In addition to the descriptive test, a panel of 17 untrained consumers evaluated the samples for overall acceptability.

2.8. Statistical analysis

Statistical analysis of the data was carried out using SPSS for Windows, 15.0. (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Mean values of the technological and analytical parameters (FZCE peaks or SDS-PAGE bands) were studied by one-way analysis of variance (ANOVA) and separated by Tukey's honest significant differences test ($P \leq 0.05$). The relationships between the technological parameters and FZCE peak area or SDS-PAGE band intensity values were evaluated by Pearson correlation coefficients. A principal component analysis (PCA) was performed on the analytical parameters and sensorial data to study the relationships between the protein profiles of the vegetable rennet and the sensory quality of the cheeses. The efficiency of the selected analytical parameters (FZCE peaks or SDS-PAGE bands) as quality control markers of the rennet was evaluated by Pearson correlation coefficients, and verified by linear regression analysis.

3. Results and discussion

3.1. FZCE and SDS-PAGE comparison

To explore the potential of the FZCE method to control the technological quality of aqueous extracts, the analytical parameters were evaluated and compared with those of the SDS-PAGE technique.

Aqueous extract from sample M1 were used to evaluate the FZCE analysis for methanol-soluble proteins. The resolution and migration times for methanol-soluble proteins were appropriate for use with the FZCE protocol proposed (Fig. 1). The proteins were resolved in 20 min and separated into 18–22 well-defined peaks and shoulders. Only the 10 most relevant peaks were studied. With respect to the analytical parameters, the FZCE method was found to give good repeatability of the CMT with coefficients of variation

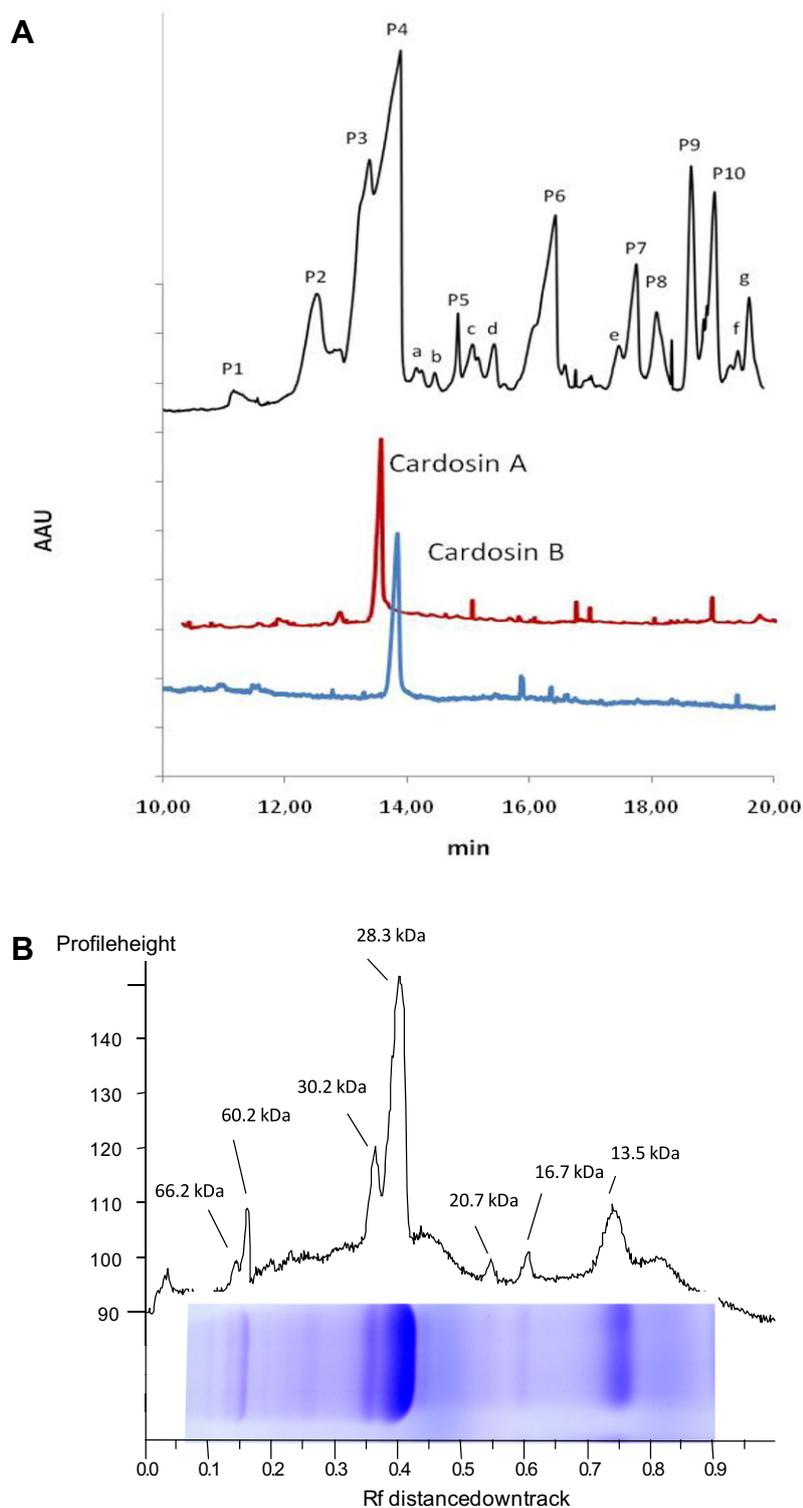


Fig. 1. Electropherogram of methanol-soluble proteins (A) and densitogram of aqueous extract proteins of dried *Cynara cardunculus* flowers (B).

(RSD%; $n = 5$) of <2% for most of the proteinaceous compounds analysed. According to CMT, the purified cardosins A and B are included in the peak 4 (Fig. 1). However, others peak such as 3, 6, and 7 could correspond to cardosins with different charge due to different glycosylation levels (Sidrach et al., 2005). In fact, these mentioned peaks showed both symmetries and absorbance spectra similar to the purified cardosins.

These results showed that the proposed FZCE protocol for methanol-soluble protein assay is a potentially useful method for monitoring the technological quality of the aqueous extracts used as rennet in “Torta del Casar” manufacture.

With respect to SDS-PAGE, the densitograms showed a total of 9 different polypeptide bands with an approximate molecular mass in the range 13.5–66.2 kDa (Fig. 1). The step of protein

Table 2

Clotting and casein proteolysis activities of vegetable rennets obtained from cardoon flowers grouped according to maturation stage, location, and harvest year.

Sample grouping	Clotting activity (R.U./ml) after maceration		% Degradation of the SDS–PAGE bands		
	1 h Mean \pm SD ^A	24 h Mean \pm SD	α -Caseins Mean \pm SD	β -Casein Mean \pm SD	κ -Casein Mean \pm SD
<i>Maturation stage</i> ^B					
a	0.142 \pm 0.032	0.173 \pm 0.081	64.92 \pm 35.29	41.72 \pm 36.71	53.51 \pm 38.83
b	0.131 \pm 0.025	0.164 \pm 0.024	93.16 \pm 6.72	77.07 \pm 13.85	75.90 \pm 23.14
c	0.160 \pm 0.027	0.271 \pm 0.151	79.06 \pm 16.96	44.70 \pm 25.02	52.29 \pm 38.71
<i>p</i> ^C	0.188	0.201	0.124	0.055	0.431
<i>Location</i> ^B					
1	0.141 \pm 0.037	0.182 \pm 0.036	91.42 \pm 4.50	62.28 \pm 7.54	89.09 \pm 1.65
2	0.133 \pm 0.024	0.149 \pm 0.019	98.51 \pm 2.01	79.63 \pm 5.64	99.10 \pm 1.40
3	0.158 \pm 0.031	0.217 \pm 0.119	71.88 \pm 27.34	53.22 \pm 30.53	41.28 \pm 32.17
4	0.118 \pm 0.020	0.159 \pm 0.009	90.23 \pm 6.42	78.53 \pm 20.22	55.04 \pm 1.45
6	0.169 \pm 0.017	0.347 \pm 0.171	80.37 \pm 17.99	38.33 \pm 7.65	77.42 \pm 26.14
<i>P</i>	0.303	0.326	0.447	0.203	0.059
<i>Year</i>					
2007	0.154 \pm 0.026	0.233 \pm 0.134	77.60 \pm 23.30	49.12 \pm 29.30	58.06 \pm 38.64
2008	0.127 \pm 0.027	0.168 \pm 0.023	90.71 \pm 5.10	72.03 \pm 17.26	68.66 \pm 18.69
<i>P</i>	0.076	0.311	0.242	0.130	0.547

^A SD, standard deviation.^B Maturation stage and location: as in Table 1.^C *P*-values.**Table 3**

Results of the relevant FZCE peaks and SDS–PAGE bands of the vegetable rennets studied at different maturation stages, and correlations with technological properties.

	Stage ^A				Correlation					
	a	b	c	<i>P</i>	Clotting activity (R.U.) after maceration		Degradation of caseins			
					1 h	24 h	α -Caseins	β -Casein	κ -Casein	
<i>FZCE</i>										
p1	15.82 ^B	11.11	17.52	0.364	0.082	0.28	–0.131	–0.287 [*]	–0.032	
p2	63.02	61.50	71.82	0.883	–0.029	–0.149	0.075	–0.238	0.119	
p3 + 4	219.59	426.15	420.36	0.420	0.428 ^{**}	0.211	0.052	0.227	0.299 [*]	
p5	23.00	106.09	56.93	0.219	0.278	–0.316	0.089	0.232	0.17	
p6	111.57	221.18	143.29	0.510	0.419 ^{**}	–0.151	0.227	0.464 ^{**}	0.018	
p7	26.62	57.99	88.12	0.755	0	0.175	0.13	0.191	0.237	
p8	13.94	33.83	97.07	0.603	0.007	0.145	0.029	0.097	0.183	
p9	23.75 ^b	224.56 ^a	32.40 ^b	0.032	0.134	–0.28	0.173	0.473 ^{**}	0.113	
p10	75.22	128.83	100.04	0.913	–0.141	–0.068	0.234	0.229	0.413 ^{**}	
Total	572.52	1271.23	1027.54	0.355	0.31	–0.039	0.234	0.468 ^{**}	0.375	
<i>SDS–PAGE</i>										
b1 (66.2 kDa)	0.00 ^C	2.24	0.87	0.282	–0.15	–0.312	0.302	0.421 ^{**}	0.229	
b2 (60.2 kDa)	6.26	10.62	6.02	0.359	–0.34	–0.204	0.14	0.25	0.054	
b3 (37.3 kDa)	0.00	1.77	1.04	0.599	–0.226	–0.232	0.142	0.224	0.211	
b4 (32.0 kDa)	17.83 ^a	5.92 ^b	3.64 ^b	0.010	–0.247	–0.044	0.093	0.126	–0.079	
b5 (30.2 kDa)	33.88	21.98	18.75	0.133	–0.284	–0.022	0.108	0.161	–0.137	
b6 (28.3 kDa)	38.14	45.32	37.40	0.560	–0.233	–0.334	0.297	0.182	0.092	
b7 (20.7 kDa)	0.00	5.18	2.14	0.345	0.029	–0.283	0.288	0.502 ^{**}	0.272	
b8 (16.7 kDa)	0.00	3.08	5.96	0.254	0.493 ^{**}	0.486 ^{**}	0.17	0.001	0.188	
b9 (13.5 kDa)	13.10	13.81	9.03	0.357	–0.167	–0.039	0.196	–0.015	–0.133	

^A Maturation stage: as in Table 1.^B FZCE peak area.^C SDS–PAGE band intensity.^{*} *P* < 0.05.^{**} *P* < 0.01.

precipitation by chloroform in the methanol soluble protein extraction procedure for the CZE analysis involved a loss of most of the apolar protein fraction with respect to the whole protein extract used in the SDS–PAGE analysis. Hence, the resolution of more proteins by CE than by PAGE may be attributed to the method. Although less effectiveness of this technique than the FZCE in discriminating vegetable varieties has been described (Cancalon, 1995; Hernández et al., 2006; Manabe, 1999), in our study there were relevant differences in the overall polypeptide profiles of the proteins from the 16 samples of aqueous extract studied. Therefore, the analysis of proteins of cardoon by SDS–PAGE could

also *a priori* be considered as a potentially useful tool for characterising the technological properties of this vegetable rennet.

3.2. Milk-clotting and proteolytic activities of the aqueous extracts and their relationship with the CE and SDS–PAGE profiles

Table 2 lists the milk-clotting and proteolytic activities of the aqueous extracts from the cardoon samples studied at different stages, locations, and years of harvest. The value ranges of milk-clotting are 0.118–0.169 and 0.149–0.347 RU/ml for 1 and 24 h of maceration, respectively. Tavaría et al. (2001) reported

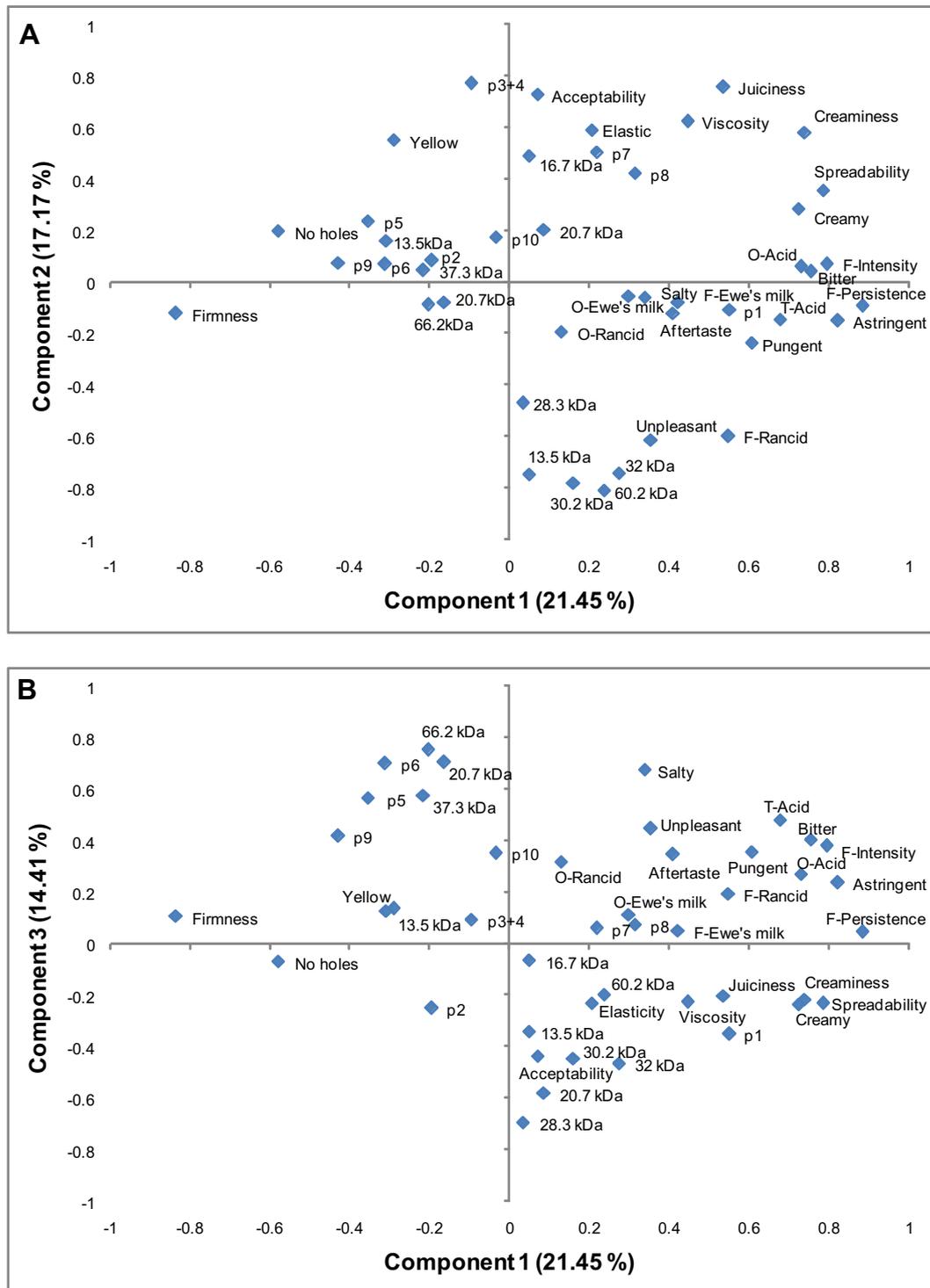


Fig. 2. Principal component analysis of the CE peaks, SDS–PAGE bands, and sensorial parameters (The prefixes T, O, and F refer to attributes of texture, odour and flavour, respectively): plane 1–2 of variable plot (A); plane 1–3 of variable plot (B).

milk-clotting values around 18 R.U./mL for 15 times more concentrated extracts of *C. cardunculus* collected in Portugal. These authors also found a higher proteolytic activity on α - than on β -casein, but the values of the degradation percentage were generally lower than those found in our study. With respect to the factor investigated (stage, location, and year), no significant differences were found in milk-clotting values or in proteolytic activities on the casein fractions, although the samples of ripening stage b

showed the highest mean values ($P < 0.1$) of β -casein degradation. A similar result was found for samples of location 2 in the case of κ -casein degradation activity. Cordeiro, Xue, Pietrzak, Pais, and Brodelius (1994) studied the proteolytic and milk-clotting activities of mature flower extracts collected at 8 different locations in Portugal, which showed some variation in proteolytic activity while the milk-clotting activity was essentially the same for all extracts. Therefore, these factors have proved ineffective as criteria

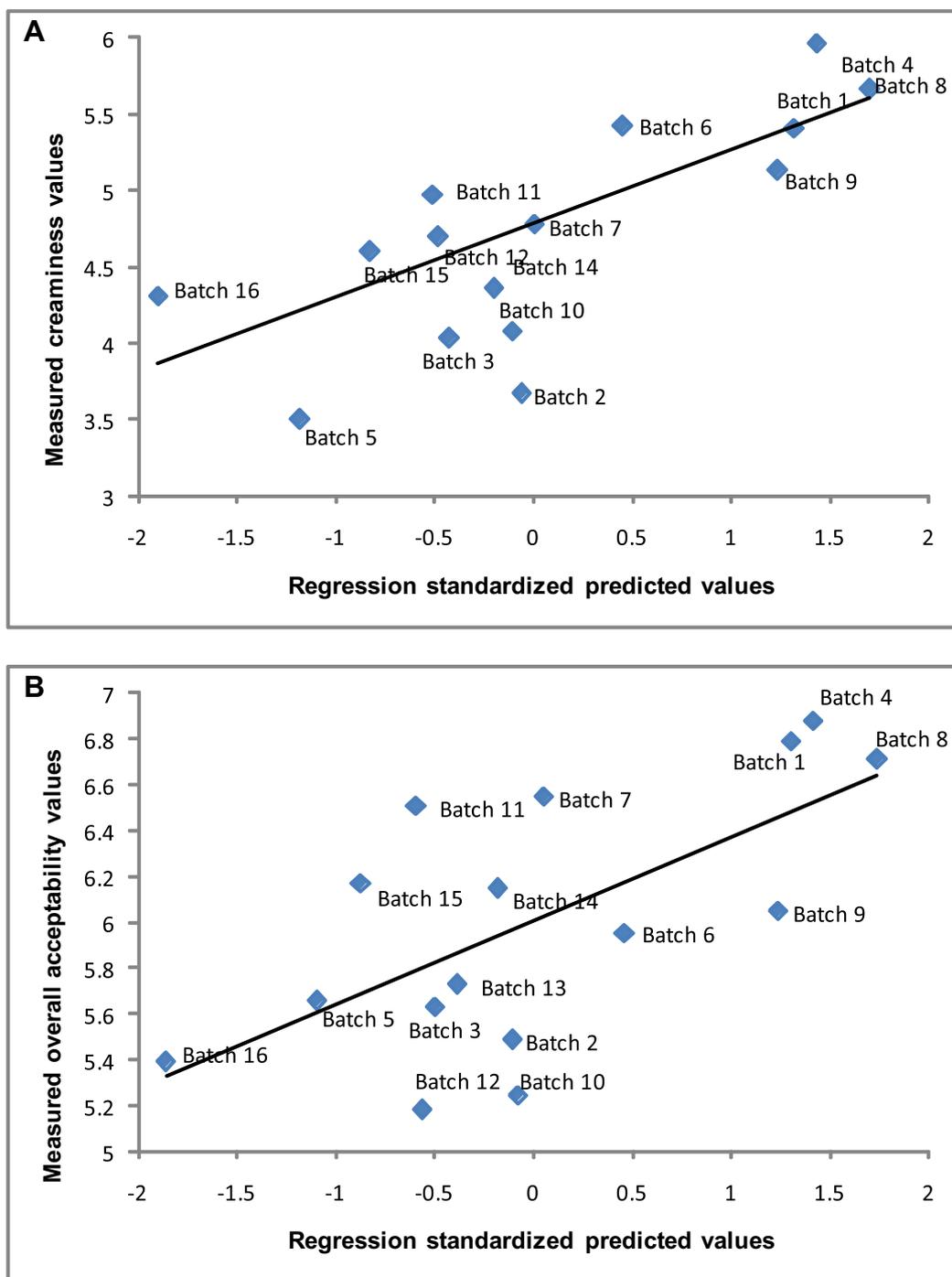


Fig. 3. Scatter plot of measured versus predicted values of attribute creaminess (A) and overall acceptability (B) derived from the PLSR analysis of CE peaks 3 + 4 and 6.

for selecting the flowers of *C. cardunculus* that are technologically appropriate for the production of vegetable rennet in the elaboration of "Torta del Casar".

Table 3 lists the mean values of the CE peak areas and SDS-PAGE band intensities from the cardoon samples grouped by different stages of harvest. In general, no relevant differences in the FZCE electroferograms were associated with the ripening stage. Only peak 9 was higher in the samples of stage b. Similar results were obtained for SDS-PAGE densitograms since only the protein band 4 of apparent molecular weight of 32 kDa showed differences, in this case being more intense in cardoon samples harvested in the initial stage. This band would correspond to the

α -subunit of cardosin B (Sousa & Malcata, 1998). Other bands were tentatively identified by their molecular weights as procardosins (66.2 and 60.2 kDa), intermediate form cardosin (38 kDa), other α -subunits of cardosins (30.2 kDa), and β -subunits of cardosins (16.7 and 13.5 kDa; Sampaio, Fortes, Cabral, Pais, & Fonseca, 2008; Verissimo et al., 1996). However, these protein bands may also include other enzymes present in the cardoon tissue (López-Molina et al., 2003).

Table 3 also lists the correlations between the analytical parameters (CE peak areas and SDS-PAGE band densities) and the milk-clotting and proteolytic activities. The areas of peaks 3 + 4 and 6 were strongly positively correlated ($P < 0.01$) with clotting activity

values after 1 h of maceration and with the κ and β casein degradation, respectively. Positive correlations were also obtained for peaks 9 and 10 with respect to β and κ casein degradation, respectively. In addition, the sum of the peak areas was positively correlated with the β -casein degradation activity. According to their casein degradation activities, the above mentioned peaks may include active cardosins or their precursors. Given that cardosin B has broader specificity (like pepsin) than cardosin A (like chymosin; Verissimo et al., 1996), the area of peaks 3 + 4 and 10, correlated with κ -casein degradation, may be mainly related to cardosin A, despite of the deglycosilated cardosin B standard is included in peak 4. On the other hand, the area of peaks 6 and 9, correlated with β -casein degradation, may be mainly related to cardosin B.

With respect to the SDS–PAGE band analysis, the intensities of bands of 66.2 and 20.7 kDa showed strong correlation with β -casein degradation; while the band 8 of 16.7 kDa, probably including β -subunits of cardosin A, were positively correlated with clotting activities (Table 3). These results showed that CE and SDS–PAGE methods could *a priori* both be useful for the technological characterisation of the aqueous extracts of flowers of *C. cardunculus*. For that, it is necessary to know the impact of these vegetable rennets with their different CE and SDS–PAGE profiles on the sensory properties of the “Torta del Casar” cheese.

3.3. Relationship between the CE and SDS–PAGE profiles of aqueous extracts and the sensorial analysis of the “Torta del Casar” cheese

The PCA analysis of the sensory descriptive attributes, overall scores, and CE and SDS–PAGE profiles showed major differences between cheese samples (Fig. 2). The first axis accounted for 21.45% of the variance and was mainly defined by flavour intensity and persistence, and pungent, astringent, and bitter taste, but also by texture descriptors such as softness (contrary to firmness) and spreadability. An increased valuation of these attributes could be partially related to a non-specific proteolytic activity of the vegetable rennet, but also mainly to other factors such as microbial proteolytic activity. In fact, no relevant correlations were found between any major CE peak or SDS–PAGE band and PC 1 (Fig. 2).

The second axis (PC 2; 17.17% of the variance) includes overall acceptability, viscosity, juiciness and to a lesser extent, creaminess, together with the CE peak 3 + 4 and SDS–PAGE band of 16.7 kDa at the top of the figure, whereas the unpleasant flavour descriptor, together with several SDS–PAGE bands (13.5, 30.2, 32.0, and 60.2 kDa), are at the bottom. As has been shown previously, both CE peaks 3 + 4 and SDS–PAGE band 16.7 kDa also have a strong correlation with clotting activity, as does the CE peak 6. However, this last peak did not correlate positively with overall acceptability or the creaminess descriptor. On the contrary, the relationship between overall acceptability and CE peak 6 was negative, according to the correlation analysis (P value < 0.1) and PC 3 (14.41% of the variance) represented in Fig. 2. With the aim of confirming peaks 3 + 4 and 6 as quality control markers, a partial least-squares regression (PLSR) method was used. The model ($r = 0.626$) indicated that 39.2% of the variation in the descriptor “creaminess” could be predicted from the areas of the selected CE peaks, as is shown in Fig. 3. Likewise, the model for the overall acceptability ($r = 0.650$) indicated that up to 42% of its variation could be predicted from these marker peaks. In contrast, the analysis by PLSR of the SDS–PAGE bands correlated with clotting or proteolytic activities did not show good results.

One can conclude that the present protocol of methanol-soluble protein extraction from aqueous extracts of *C. cardunculus* flowers and the FZCE analysis procedure provide a fast, economic, and efficient method for the technological characterisation of this vegetable rennet in the processing of “Torta del Casar”. We have therefore

proposed that this technique be used routinely for the quality control of the vegetable rennet used in the manufacturing process for the Registry of the Protected Designation of Origin “Torta del Casar”.

Acknowledgements

The authors are grateful to M. Cabrero and C. Cebrián for technical assistance and PDO “Torta del Casar” for technical support.

References

- Bean, S. R., & Lookhart, G. L. (2001). Recent developments in high performance capillary electrophoresis of cereal proteins. *Electrophoresis*, 22, 1503–1509.
- Bietz, J. A. (1994). Fractionation of wheat gluten proteins by capillary electrophoresis. In *Gluten proteins* (pp. 404–413). Detmold, Germany: Association of Cereal Research.
- Brodelius, P. E., Cordeiro, M. C., & Pais, M. S. (1995). Aspartic proteinases (cyprosin) from *Cynara cardunculus* spp. *flavescens* cv. cardoon: Purification, characterisation, and tissue-specific expression. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 362, 255–266.
- Cancelon, P. F. (1995). Capillary electrophoresis: A useful technique for food analysis. *Food Technology*, 49, 52–58.
- Cattaneo, T. M. P., Nigro, F., Toppino, P. M., & Denti, V. (1996). Characterization of ewe's milk by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 721, 345–349.
- Cordeiro, M. C., Xue, Z. T., Pietrzak, M., Pais, M. S., & Brodelius, P. E. (1994). Isolation and characterization of an cDNA from flowers of *Cynara cardunculus* encoding cyprosin (an aspartic proteinase) and its use to study the organ-specific expression of cyprosin. *Plant Molecular Biology*, 24, 733–741.
- Heimgartner, U., Pietrzak, M., Geertsens, R., Brodelius, P., Silva Figueredo, A. C., & Pais, M. S. (1990). Purification and partial characterization of milk clotting proteases from flowers of *Cynara cardunculus*. *Phytochemistry*, 29, 1405–1410.
- Hernández, A., Martín, A., Aranda, E., Bartolomé, T., & Córdoba, M. G. (2006). Detection of smoked paprika “Pimentón de la Vera” adulteration by free zone capillary electrophoresis (FZCE). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(12), 4141–4147.
- Hernández, A., Martín, A., Aranda, E., Bartolomé, T., & Córdoba, M. G. (2007). Application of temperature-induced phase partition of proteins for the detection of smoked paprika adulteration by free zone capillary electrophoresis (FZCE). *Food Chemistry*, 105, 1219–1227.
- International Organization for Standardization (ISO). UNE-ISO 4121-2006. Sensory analysis—guidelines for the use of quantitative response scales; ISO: Geneva, Switzerland.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- López-Molina, D., Heering, H. A., Smulevich, G., Tudela, J., Thorneley, R. N. F., García-Canovás, F., et al. (2003). Purification and characterization of a new cationic peroxidase from fresh flowers of *Cynara scolymus*, L. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 94, 243–254.
- Macedo, I. Q., Faro, C. J., & Pires, E. V. (1993). Specificity and kinetics of the milk-clotting enzyme from Cardoon (*Cynara cardunculus*, L.) toward bovine k -casein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1537–1540.
- Manabe, T. (1999). Capillary electrophoresis of proteins for proteomic studies. *Electrophoresis*, 20, 3116–3121.
- Martins, A. P. L., Vasconcelos, M. M. P., & Sousa, R. B. (1996). Thistle (*Cynara cardunculus*, L.) flower as a coagulant agent for cheesemaking: Sort characterization. *Lait*, 76, 437–477.
- Pires, E., Faro, C., Macedo, I., Esteves, C., Morgado, J., Verissimo, P., et al. (1994). Flor do cardo versus quimosina no fabrico de queijos artesanais. *Revista da Sociedade Portuguesa de Química*, 54, 66–68.
- Otte, J., Ardö, Y., Weimer, B., & Sorensen, J. (1999). Capillary electrophoresis used to measure proteolysis in cheese. *Bulletin International Dairy Federation*, 337, 10–16.
- Recio, I., Ramos, M., & López-Fandiño, R. (2001). Capillary electrophoresis for the analysis of food proteins of animal origin. *Electrophoresis*, 22, 1489–1502.
- Recio, I., Amigo, L., & López-Fandiño, R. (1997). Assessment of the quality of dairy products by capillary electrophoresis of milk proteins. *Journal of Chromatography B*, 697, 231–242.
- Regulation (CE) 1491/2003 of European commission of 25 of august: Registration of the protected designation of origin “Torta del Casar” in the register of protected designations of origin and the protected geographic indications.
- Roseiro, L. B., Barbosa, M., Ames, J. A., & Wilbey, R. A. (2003). Cheesemaking with vegetable coagulants – The use of *Cynara* L. for the production of ovine milk cheeses. *International Journal Dairy Technology*, 56, 76–85.
- Roseiro, L. B., Gómez-Ruiz, J. A., García-Risco, M., & Molina, E. (2003). Vegetable coagulant (*Cynara cardunculus*) use evidenced by capillary electrophoresis permits PDO Serpa cheese authentication. *Lait*, 83, 343–350.
- Sampaio, P. N., Fortes, A. M., Cabral, J. M. S., Pais, M. S., & Fonseca, L. P. (2008). Production and characterization of recombinant Cyprosin B in *Sacharomyces cerevisiae* (W303–1A) strain. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 105(4), 305–312.

- Serradilla, M. J., Martín, A., Aranda, E., Hernández, A., Benito, M. J., López-Corrales, M., et al. (2008). Authentication of "Cereza del Jerte" sweet cherry varieties by free zone capillary electrophoresis (FZCE). *Food Chemistry*, *111*, 457–461.
- Sidrach, L., García-Canovás, F., Tudela, J., & Rodríguez-López, J. N. (2005). Purification of cynarases from artichoke (*Cynara scolymus*, L.): Enzymatic properties of cynarase A. *Phytochemistry*, *66*, 41–49.
- Silva, S. V., & Malcata, F. X. (1999). On the activity and specificity of cardosin B, a plant proteinase on ovine caseins. *Food Chemistry*, *67*, 373–378.
- Sousa, M. J., & Malcata, F. X. (1998). Proteolysis of ovine and caprine caseins in solution by enzymatic extracts from flowers of *Cynara cardunculus*. *Enzyme Microbiology and Technology*, *22*, 305–314.
- Tavaria, F. K., Sousa, M. J., & Malcata, F. X. (2001). Storage and lyophilization effects of extracts of *Cynara cardunculus* on the degradation of ovine and caprine caseins. *Food Chemistry*, *72*, 79–88.
- Valdés, B., Talavera, S. & Fernández-Galiano, E. (1987). In: *Flora vascular de Andalucía Occidental*. Ketres Editora, S.A. Barcelona: España.
- Verissimo, P., Esteves, C., Faro, C., & Pires, E. (1995). The vegetable rennet of *Cynara cardunculus* L. contains two proteinases with chymosin and pepsin-like specificities. *Biotechnology Letters*, *17*, 621–626.
- Verissimo, P., Faro, C., Moir, A. J., Lin, Y., Tang, J., & Pires, E. (1996). Purification, characterization, and partial amino acid sequencing of two new aspartic proteinases from fresh flowers of *Cynara cardunculus*, L. *European Journal Biochemistry*, *235*, 762–768.

IV.3. CAPÍTULO III

El objetivo 3 planteado en este trabajo se aborda en este capítulo, en el que se estudia la influencia de las diferencias encontradas entre muestras de *Cynara cardunculus*, en cuanto a sus características tecnológicas como cuajo, en las características físico – químicas y sensoriales en los quesos tipo “Torta del Casar” elaboradas. También se estudia la influencia de la microbiología presente en las características del producto final. Este capítulo consta de los siguientes artículos:

IV.3.1. Influence of technological properties of vegetable rennet (*Cynara cardunculus*) on the texture of “Torta del Casar” cheese.

Enviado a la revista “Journal of Dairy Science”

IV.3.2. Proteolysis effect of *Cynara cardunculus* rennet from different plant selected for being used in the elaboration of “Torta del Casar” cheese.

Enviado a la revista “Food Control”

IV.3.3. Role of autochthonous microorganisms on the texture characteristics of the traditional cheese “Torta del Casar”.

IV.3.1. Influence of technological properties of vegetable rennet (*Cynara cardunculus*) on the texture of “Torta del Casar” cheese.

Enviado a la revista “Journal of Dairy Science”.



**Influence of technological properties of vegetable rennet
(*Cynara cardunculus*) on the texture of "Torta del Casar"
cheese**

Journal:	<i>Journal of Dairy Science</i>
Manuscript ID:	JDS-12-5836
Article Type:	Research
Date Submitted by the Author:	14-Jun-2012
Complete List of Authors:	Ordiales, Elena; Centro Tecnológico Agroalimentario Extremadura (CTAEX), Agricultura Martín, Alberto; Extremadura University, Nutricion y Bromatologia Benito, Maria; Extremadura University, Nutricion y Bromatologia Fernández, Margarita; Extremadura University, Nutricion y Bromatologia Casquete, Rocio; Extremadura University, Nutricion y Bromatologia Cordoba, Maria de Guia; Extremadura University, Nutricion y Bromatologia
Key Words:	Biotechnology, soft-bodied cheese, vegetable rennet

SCHOLARONE™
Manuscripts

1 **Influence of technological properties of vegetable rennet (*Cynara cardunculus*) on**
2 **the texture of “Torta del Casar” cheese.**

3

4 **E. Ordiales,* A. Martín^{1,†} M. J. Benito[†], M. Fernández,[†] R. Casquete,[†] M. G.**
5 **Córdoba [†]**

6

7 *Agricultura, Centro Tecnológico Agroalimentario Extremadura (CTAEX), Ctra.
8 Villafranco a Balboa Km. 1.2, Villafranco del Gadiana, 06195 Badajoz, Spain.

9

10 [†] Nutrición y Bromatología, Escuela de Ingenierías Agrarias, Universidad de
11 Extremadura, Ctra. de Cáceres s/n, 06071 Badajoz, Spain.

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21 ¹Corresponding author

22 Tel.: +34 924 286200; fax: +34 924 286201

23 E-mail address: amartin@unex.es

24 <http://eia.unex.es>

25

26 **ABSTRACT**

27 The purpose of this work was to investigate the influence of technological properties of
28 vegetable rennet on the texture of "Torta del Casar" cheese to establish the parameters
29 that can be useful for quality control of this coagulant. A total of 16 batches of cardoon
30 flowers (*Cynara cardunculus*) grouped according to location, harvest year, and ripening
31 stage were used to make aqueous coagulant extracts in which clotting and casein
32 proteolytic activities were determined. The physicochemical, microbial, textural, and
33 sensorial properties of the "Torta del Casar" cheeses were evaluated during ripening,
34 and then related to the technological properties of the vegetable rennet batches used for
35 their elaboration. Although the differences in the clotting and proteolytic activities of
36 vegetable rennets were not attributable to the factors studied, they had a relevant impact
37 on both the physico-chemical parameters in the initial processing stages of "Torta del
38 Casar" and the texture and sensorial analysis of the final product. The level of *in vitro*
39 degradation of caseins by the aqueous extract used (specifically the activity against α -
40 casein and κ -casein/ β -casein degradation ratio) were found to be good tools with which
41 to predict the effect of vegetable rennet on the rheological properties of the "Torta del
42 Casar" cheese.

43

44

45 Keywords: vegetable rennet, clotting activity, proteolytic activity, texture, soft-bodied
46 cheese.

47

48

49

INTRODUCTION

50 “Torta del Casar” is a high quality Spanish cheese marketed under the Registry
51 of the Protected Designation of Origin “Torta del Casar” (Casar de Cáceres, Cáceres,
52 Spain) in accordance with Regulation (CE) 1491/2003 of the European Commission.
53 This type of cheese is made from raw ewe’s milk, using only the dried flowers of the
54 plant *Cynara cardunculus* as rennet, and without any deliberate addition of a starter.

55 Extracts of *C. cardunculus* are reported as containing two proteinases, cardosin
56 A and cardosin B (Sousa, 1993; Veríssimo et al., 1995, 1996). Studies of their
57 specificity and kinetics on the oxidized B-chain of insulin show that cardosin A has
58 cleavage specificity similar to chymosin, whereas cardosin B resembles pepsin (Faro et
59 al., 1992; Veríssimo et al., 1995; Ramalho-Santos et al., 1996). Cardosins are
60 characterized by high milk-clotting activity, cleaving the peptide bond Phe₁₀₅-Met₁₀₆ in
61 bovine (Macedo et al., 1993) and ovine κ -casein (Sousa and Malcata, 1998). In addition
62 to a clotting activity similar to that of chymosin, this vegetable rennet also displays a
63 strong proteolytic action in vitro. This activity eventually leads to extensive breakdown
64 of the caseins in the cheese matrix (Macedo and Malcata, 1996), producing cheese
65 characterized by a soft buttery texture and the development of a typical aroma and a
66 slightly piquant and creamy flavour (Galán et al., 2008; Tavaría et al., 2001). This
67 aspect is well suited to the manufacture of the soft-bodied “Torta del Casar” cheeses
68 often associated with bitter tastes and relatively low yields.

69 Traditional aqueous extracts are made from *Cynara cardunculus* flowers of
70 diverse natural populations harvested at different flower ripening stages and mixed with
71 other parts of the plant. In addition, the milk clotting activity of the flowers shows great
72 variability mainly related to the drying conditions (Martins et al., 1996). This major

3

73 heterogeneity of the rennet used in “Torta del Casar” manufacture has a negative
74 influence on the cheese’s quality parameters, including low yield, lack of homogeneity
75 between batches of relevant sensorial factors, such as texture parameters (Tunick,
76 2000). Thus, technological quality control of the aqueous extracts used as rennet would
77 be desirable for standardization of the cheese-making process. Rheological properties
78 are important monitors of quality control in cheese processing and in scientific research
79 (Park, 2007).

80 The objective of this work was to study the effect of the clotting and proteolytic
81 activities of different aqueous extracts of *Cynara cardunculus* used as rennet on the
82 texture quality of “Torta del Casar” cheese.

83 MATERIALS AND METHODS

84 *Plant Material*

85 The samples of cardoon (*Cynara cardunculus*, L.) used in this study were
86 identified previously in accordance with the guidelines of Valdés et al. (1987). They
87 were collected from six locations during the seasons of the years 2007 and 2008, and
88 grouped into 3 different ripening stages in accordance with the cardoon flower’s
89 phenological characteristics (Table 1) (Ordiales et al., 2012), ripening stage a (flowers
90 opening, only some styles and stigmas visible), b (flowers fully open, even with pollen),
91 and c (flowers begin to dry, so that they are brownish, instead of violet). The collected
92 flowers were dried and kept in a cool dry place until use.

93 *Milk-clotting Activity*

94 For the milk-clotting trials, 0.5 g aliquots of each cardoon sample were softened
95 in 75 ml of ultrapure water for 1 h and 24 h. The rennet clotting time of these coagulant
96 extracts was measured according to a standard method (NILACTM; NIZO, Ede, The
97 Netherlands) described by Tavaría et al. (2001). The substrate was prepared by
98 dissolving 12 g of low-heat bovine skimmed milk powder in 100 mL of 0.01 M CaCl₂
99 (pH 6.5) at 30°C. The enzymatic assay was performed using 0.2 mL of coagulant extract
100 added to 2 mL of reconstituted skim milk, and the clotting time was determined by
101 visual inspection. One rennet unit (R.U.) was defined as the amount of crude enzyme
102 extract needed to coagulate 10 mL of reconstituted low-heat processed skim milk at
103 30°C in 100 s (FIL-IDF 157/1992). Determinations were quadruplicated, and the mean
104 of each set of four data was taken as the datum point.

105 *In vitro Casein Proteolytic Activity*

106 The dried flower extracts were prepared by macerating 0.25 g of dried flowers in
107 5 mL of water (corresponding to a proportion of 50 g in 1 L) at room temperature for 4
108 h. The homogenate was filtered through a Whatman No. 4 filter. The substrate used for
109 degradation by the extracts consisted of a mix of bovine caseins (Sigma Aldrich, Co.,
110 St. Louis, MO, USA) (α , β , and κ), at a concentration of 0.5 mg/mL of each casein,
111 dissolved in 5 ml of distilled water. The dried flower extracts were macerated with the
112 casein mix, at 2.5% of extract (vol/vol), for 2 h at room temperature to allow casein
113 degradation. After this time the extracts with degraded caseins were denatured by
114 adding 30 μ L of SDS-PAGE loading buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 20% (wt/vol)
115 glycerol, 2% (wt/vol) SDS, 5% (wt/vol) β -mercaptoethanol, 0.025% (wt/vol)
116 bromophenol blue) and incubated at 99° C for 5 min.

117 The electrophoresis conditions were those described by Laemmli (1970), and the
118 concentrations of acrylamide (29:1 acrylamide/bisacrylamide) in the gels were 4%
119 (wt/vol) for stacking gels and 15% (wt/vol) for separating gels. The gels were cast and
120 run in a Miniprotean III device (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). The molecular
121 mass marker kits (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) contained proteins from 6.5 to
122 205 kDa. The gels were subsequently stained with 0.5% (wt/vol) Coomassie blue (G-
123 250) dissolved in 45% (vol/vol) water, 45% (vol/vol) methanol, and 10% (vol/vol)
124 acetic acid for 30 min, and destained with a solution consisting of 20% (vol/vol)
125 methanol, 10% (vol/vol) acetic acid, and 70% (vol/vol) distilled water for 4 h. A
126 computer image analysis program (Genetools, Synoptics Ltd., Cambridge, U.K.) was
127 used for the densitometric analysis of the gel electrophoreses.

128 ***“Torta del Casar” Cheese-making Procedure***

129 A total of sixteen batches of “Torta del Casar” were manufactured, of 10 cheeses
130 each batch, from unpasteurized Merino ewe’s milk to which no starter cultured was
131 added. Each batch was clotted using a *C. cardunculus L.* rennet, corresponding to the
132 samples listed in Table 1. The aqueous extracts from the cardoon *C. cardunculus L.*
133 were prepared from 50 g of dried flowers in 1 L of water, leaving them to macerate for
134 24 h, and adding 10 mL of this extract per litre of milk at 28–30°C, for each 32 L batch.
135 After pressing, the cheeses were immersed in a salt solution (16% (wt/vol) NaCl) for 4
136 hours. The ripening took place at a temperature of 5–10°C and relative humidity of 85–
137 90% throughout the ripening period of 60 days. Three cheeses of each batch were
138 randomly taken for analysis after 2, 30 and 60 days of ripening.

139 ***Physico-chemical Parameters***

140 The moisture content of the cheeses was determined by dehydration at 100°C to
141 a constant weight by the ISO recommended methods (ISO, 1973). Water activity (A_w)
142 was determined using an FA-St/1 apparatus from GBX (France Scientific Instrument).
143 The pH was measured using a Crison mod. 2002 pH meter (Crison Instruments,
144 Barcelona, Spain). Total protein was determined by the Kjeldahl method (International
145 Dairy Federation (IDF), 1993), with a Kjeltex system 1002 distilling unit (Tecator,
146 Hoganas, Sweden). Fat content was determined by the Gerber method as described by
147 the Netherlands Standard NEN 3059 (1969).

148 The yield was determined as the quantity of cheese obtained from a volume of
149 milk, expressed as %. Cutting time was considered to be the time needed for curd to be
150 formed, from the moment rennet is added to the moment the curd is cut.

151 ***Microbial Count***

152 For the microbial counts and isolates, 10 g aliquots of each cheese sample were
153 taken aseptically, transferred to sterile plastic pouches, 10-fold diluted with 1% peptone
154 water (Pronadisa, Alcobendas, Madrid, Spain), and homogenized for 120 s using the
155 laboratory Stomacher Lab-Blender 400 (Seward Lab., London, England). Serial 10-fold
156 dilutions were prepared from the same solution and inoculated onto agar plates.

157 Plate count agar (PCA, Oxoid) was used for mesophilic aerobic bacteria counts
158 at 30°C for 48 h, and for psychrotrophs for 7 days at 7°C. LAB were grown in MRS
159 agar (Oxoid) whose pH was adjusted to 5.6 with acetic acid (10%), incubating at 37°C
160 for 2 days under anaerobic conditions. The Gram positive catalase positive (GPCP)
161 cocci counts were determined in MSA agar (Oxoid) at 30°C for 48 h, counting typical
162 colonies.

163 *Texture*

164 Two different instrumental texture analyses were performed using a TA.XTA2i
165 texture analyzer (Stable Micro Systems, Godalming, UK).

166 Texture compression analysis (TCA) of the samples was performed at room
167 temperature, using a cylindrical probe of 4 mm diameter. The procedure involved
168 cutting slices approximately 1.5 cm thick. Force–time curves were recorded at a cross-
169 head speed of 1 mm s⁻¹ and 10 mm distance. Hardness (g), defined as maximum peak
170 force during a compression cycle, cohesiveness (g s), area under the positive curve,
171 adhesiveness (g), maximum negative peak, and F-T 2:3 area (g s), area under the
172 negative curve, were evaluated at 2, 30, and 60 days of the process.

173 A texture spreadability analysis (TSA) was also performed at 60 days of
174 ripening using a TTC Spreadability Fixture probe. The samples were packed into the
175 lower cone with a spatula. The curves were produced at a test speed of 3 mm s⁻¹ and 25
176 mm distance. Firmness (g) and work of shear (g s) will be the maximum peak and the
177 area under the first curve. The maximum negative peak indicates the stickiness (g) of
178 the sample, and the maximum negative area is taken as the work of adhesion (g s).

179 *Sensory Evaluation*

180 Fifteen panelists, previously selected and trained under ISO standards with
181 samples of “Torta del Casar” cheese, were asked to characterize the sensory quality of
182 the batches selected according to the protein profile of the cardoon used for the clotting
183 stage. The cheeses were cut into slices of approximately 5 mm thickness. The slices
184 were equilibrated for 30 min at room temperature before serving. Descriptive analyses
185 were made according to international standard methods. Eight parameters related to

186 appearance (creamy, no holes, elastic, spreadability) and texture (firmness, creaminess,
187 viscosity, juiciness) were assessed using a structured line scale with intensity
188 descriptors at the end points (1, low; 10, high). The samples were three-digit coded and
189 the order of serving was determined by random permutation. Two replicate panels
190 performed for each sample. The response to each indicator was taken as the mean of the
191 panellists' responses. In addition to this descriptive test, a panel of 17 untrained
192 consumers evaluated the samples for overall acceptability.

193 *Statistical Analysis*

194 Statistical analysis of the data was carried out using SPSS for Windows, 15.0.
195 (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA). Descriptive statistics of the vegetable rennet
196 activities were determined, and the evolution of the physicochemical, microbial, and
197 texture parameters of the cheese batches were studied by one-way analysis of variance
198 (ANOVA), and separated by Tukey's honest significant differences test ($P \leq 0.05$). The
199 relationships between the enzymatic activities of the aqueous extracts and the physico-
200 chemical parameters of the cheeses after 2 days of ripening were evaluated in terms of
201 Pearson correlation coefficients. A principal component analysis (PCA) was performed
202 on the technological properties of vegetable rennet, the texture parameters and sensorial
203 data of the final product to study the relationships between the clotting and proteolytic
204 activities of the vegetable rennet and the texture quality of the cheeses. The efficiency
205 of the selected coagulant parameters as quality control markers of the rennet was
206 evaluated in terms of Pearson correlation coefficients, and verified by linear regression
207 analysis.

208

RESULTS AND DISCUSSION**209 *Technological Properties of the Vegetable Rennets***

210 Table 1 presents the results for the technological properties of the vegetable
211 rennets. They showed relevant differences in both clotting and proteolytic values among
212 the samples studied. These differences were not at the level of the maturation of the
213 cardoon or its location since a high intra-group variability was observed in both factors
214 (data not shown). Cordeiro et al. (1994) studied the proteolytic and milk-clotting
215 activities of mature flower extracts collected at 8 different locations in Portugal. They
216 found some variation in proteolytic activity, but for the milk-clotting activity they did
217 not appreciate any significant differences among the locations corresponding to extracts.
218 The value ranges for milk-clotting were 0.092-0.185 and 0.136-0.512 RU/ml for 1 and
219 24 hours of maceration, respectively. Tavarria et al. (2001) reported milk-clotting values
220 of around 18 RU/mL for 15 times more concentrated extracts of *Cynara cardunculus*
221 collected in Portugal. They also found greater proteolytic activity on α - than on β -
222 casein. In the present study, the α -casein degradation varied from 24.39% (sample M15)
223 to 100% (samples M1 and M3), and the β -casein and κ -casein degradation ranges were
224 4.32-91.55% and 4.21-98.43%, respectively (Table 1). Silva and Malcata (1999) also
225 found that α_s -caseins were hydrolysed faster than β -caseins in in vitro trials. This is
226 comparable to the case in cheese, since it has been reported that β -casein is less
227 susceptible to proteolysis than α_s -caseins in the manufacture of raw ewe's milk cheese
228 in which extracts of *C. cardunculus* are used as coagulant (Sousa and Malcata, 1997;
229 Roa et al., 1999).

230 *Influence of Vegetable Rennets on Cutting Time, Curd Yield, and the*
231 *Physicochemical Properties of Fresh Cheese*

10

232 Table 2 lists the descriptive statistics of cutting time and curd yield for the
233 batches studied, and the physicochemical characteristics of the fresh cheeses with 2
234 days of ripening. These data were correlated with the technological properties of the
235 vegetable rennets used for their elaboration. The cutting time varied between 35 and 75
236 min, and showed a negative correlation with the clotting activity of the aqueous extract
237 after 24 h of maceration. However, this parameter was also positively correlated with
238 unspecified proteolytic activity against whole caseins (Table 2). Although some studies
239 have examined the gelling properties of the proteases present in plant coagulants, no
240 data were available in the literature concerning the properties of each cardosin and its
241 independent contribution to the overall milk-clotting activity and gelling properties.
242 Silva et al. (2003) showed that different cardosins have very different rheological
243 properties, as well as from chymosin. This type of knowledge is important in order to
244 rationally reduce the variability in cheesemaking using *C. Cardunculus* extracts.

245 The mean value of the curd yield was low (23.8%), confirming previous results
246 (Agboola et al., 2009). Mas Mayoral et al. (1991) report slightly lower cheese yields
247 with values between 16.5 and 20%. This parameter was not clearly linked to clotting
248 activities but had a positive correlation with the degradation of κ -casein, the primary
249 stage of milk coagulation.

250 With respect to the physicochemical parameters of the fresh cheeses, the mean
251 values of moisture and pH were 56.61% and 6.85 respectively and a_w ranged from 0.96
252 to 0.99. Sanjuán et al. (2002) studied the influence of vegetable rennet on the
253 physicochemical characteristics of the soft cheese "Los Pedroches" during ripening. At
254 2 days of ripening, moisture of cheeses was 51.63 %, the pH was 5.6, and a_w 0.98. pH
255 values were positively correlated with the whole proteolytic activity of the aqueous

256 extracts, a fact attributable to the buffer effect generated by the products of protein
257 hydrolysis (Shammet et al., 1992).

258 For the protein and fat percentages, the mean values were 16.72 and 25.31,
259 respectively, in agreement with other studies (Mas Mayoral et al., 1991). In addition,
260 the total protein showed a positive correlation with the clotting activity of the vegetable
261 rennet extract after 1h of maceration (Table 2), together a negative correlation with
262 moisture ($P < 0.1$). Better curd gelling associated with clotting activities of the
263 vegetable rennet may, at last partially, explain these results.

264 *Evolution of Physicochemical, Microbial, and Texture Parameters during Cheese* 265 *Ripening*

266 The evolution of the physicochemical parameters during ripening is presented in
267 Figure 1. There were significant differences ($P < 0.05$) in moisture and pH values
268 during cheese ripening, with decreases until the end of processing. The mean moisture
269 values varied from 56.61 (2 days of ripening) to 40.81 (60 days of ripening), and the pH
270 values ranged from 6.85 (2 days of ripening) to 5.65 (60 days of ripening). The results
271 were similar to those obtained for other soft cheeses (Roa et al., 1999; Sanjuán et al.,
272 2002). These pH changes may reflect the major metabolic activity of lactic acid bacteria
273 in this type of ewe's milk cheese.

274 The mean counts of total viable bacteria and LAB were greater than 8 log CFU
275 g^{-1} throughout ripening with high variability in the initial stage (2 days of ripening). In
276 the case of the GPCP cocci, the counts for during ripening were essentially constant
277 with values close to 7 log cfu g^{-1} (Figure 1). No correlation was observed between
278 coagulant extract activity and the counts of these microbial groups. The counts of TVC,

279 LAB, and GPCP cocci were similar to those found in other fresh soft cheeses clotted
280 with vegetable rennets. Lactic acid bacteria appear to be the predominant microbial
281 groups in Serra da Estrela cheese (Tavaira et al., 1998), in which they eventually reach
282 viable numbers of ca. $7 \log \text{cfu g}^{-1}$ by the time of consumption (Pintado et al., 2010).
283 Obviously, regardless of the vegetable rennet's characteristics, these high levels of
284 microorganisms during ripening may be playing a relevant role in the development of
285 the sensory characteristics of "Torta del Casar" cheese, including its texture.

286 Figure 1 also shows the textural changes in TCA hardness, cohesiveness,
287 adhesiveness, and area F-T 2:3 of cheese samples during maturation. The hardness and
288 cohesiveness values decreased, mainly at the end of ripening, whereas adhesiveness and
289 area F-T 2:3 had the lowest values at 30 days of ripening. The values of the TCA
290 parameters found in the present work are concordant with those observed in other
291 cheeses made with vegetable rennet. In the case of TCA, hardness and adhesiveness
292 were much lower than in cheeses elaborated with animal rennet (Agbola et al., 2009).
293 The mean values of the TCA parameters may be attributed to extensive proteolysis in
294 this type of cardoon-coagulated cheese. Differences in the technological properties of
295 the vegetable rennet may condition the sensorial characteristics of "Torta del Casar"
296 cheese.

297 *Effect of Vegetable Rennets on Sensorial Characteristics of "Torta del Casar" Cheese*

298 The PCA of the descriptive sensory attributes, overall scores, texture parameters,
299 and technological properties of vegetable rennets showed major differences among
300 cheese samples elaborated with different coagulant extracts after 60 days of ripening
301 (Figure 2). The first axis accounted for 29.83% of the variance, and was mainly defined
302 by sensorial descriptors such as softness (contrary to firmness (SD4)), spreadability

303 (SD3), viscosity (SD6), juiciness (SD7), and creaminess (SD5); but also by the clotting
304 activity of the rennet after 24 h of maturation (CA24), and to a lesser extent, overall
305 acceptability (SH1). Specifically, the values of viscosity and creaminess, and overall
306 acceptability in the sensorial analysis of the cheeses showed significant positive
307 correlations with the clotting activities of the aqueous extracts used after 24 h of
308 maturation. A high valuation of these attributes could thus be partially related to this
309 activity of the vegetable rennet, but also to other factors such as microbial proteolytic
310 activity (Macedo et al., 1996; Tavaira and Malcata, 2003). With respect to the
311 proteolytic activity of the vegetable extracts on casein fractions (β -casein (PAb) α -
312 casein (PAa), and κ -casein (PAk)), they were not clearly associated with any PC, and
313 their explained variability was distributed over the three PCs studied.

314 The second and third axes (28.30 and 11.57% of the variance, respectively) were
315 defined by most of the texture parameters, and to a lesser extent by overall acceptability
316 and the in vitro proteolytic degradation of caseins. A significant negative correlation
317 was found between the in vitro whole casein degradation of the vegetable rennets and
318 the TSA parameters firmness (TS1) and work of shear (TS2) of cheeses with 60 days of
319 ripening, evidence for the influence of the vegetable extract's characteristics on the final
320 texture properties of "Torta del Casar" cheese. This effect was translated to the overall
321 acceptability, but it not was clearly related to descriptive attributes of the sensory
322 analysis. Indeed, the sensory descriptor creaminess (SD5) was located opposite β -casein
323 degradation with respect to PC1 axis, showing a significant negative correlation. It is
324 possible that the increase in this non-specific activity on casein micelles affects the
325 coagulation process when, resulting in a less cream product.

326 To confirm the influence of the technological characteristics of the vegetable

327 rennet on the rheological properties of "Torta del Casar" cheese, a partial least-squares
328 regression (PLSR) method was used. The model ($r = 0.688$) indicated that 47.4 % of the
329 variation in the TSA parameter "work of shear" of cheeses could be predicted from the
330 level of *in vitro* degradation of caseins by the aqueous extract used. Concretely from the
331 α -casein degradation and the κ -casein/ β -casein degradation ratio as is shown in Figure
332 3.

333

CONCLUSIONS

334 One can conclude that the differences in the clotting and proteolytic activities of
335 vegetable rennets used in the elaboration of soft-type cheeses have an important impact
336 on both the physicochemical parameters in initial stages and the texture and sensorial
337 properties of final product. Clotting activity after 24 h of maceration and the intensity of
338 β -casein degradation correlated with sensorial creaminess. The whole casein
339 degradation capacity of the aqueous extracts conditioned the TSA parameters such as
340 firmness and work of shear. We therefore proposed the use of both clotting activity after
341 24 h of maceration and *in vitro* casein degradation for the routine quality control of the
342 vegetable rennet used in the manufacturing process of "Torta del Casar" cheeses for the
343 Registry of their Protected Designation of Origin.

344

ACKNOWLEDGEMENTS

345 The authors are grateful to M. Cabrero and C. Cebrián for technical assistance,
346 and to PDO "Torta del Casar" for technical support.

347

REFERENCES

- 348 Agboola, S. O., H. H. Chan, J. Zhao, and A. Rehman. 2009. Can the use of Australian
349 cardoon (*Cynara cardunculus*, L.) coagulant overcome the quality problems
350 associated with cheese made from ultrafiltered milk?. LWT – Food Sci. Technol.
351 42:1352-1359.
- 352 Cordeiro, M. C., Z. T. Xue, M. Pietrzak, M. S. Pais, and P. E. Brodelius. 1994. Isolation
353 and characterization of an cDNA from flowers of *Cynara cardunculus* encoding
354 cyprosin (an aspartic proteinase) and its use to study the organ-specific
355 expression of cyprosin. Plant Mol. Biol. 24:733-741.
- 356 Faro, C. C., A. J. Moir, and E. V. Pires. 1992. Specificity of a milk-clotting enzyme
357 extracted from the thistle *Cynara cardunculus* L.: Action on oxidized insulin and
358 k-casein. Biotechnol. Lett. 14: 841-846.
- 359 Galán, E., F. Prados, A. Pino, L. Tejada, and J. Fernández-Salguero. 2008. Influence of
360 different amounts of vegetable coagulant from cardoon *Cynara cardunculus* and
361 calf rennet on the proteolysis and sensory characteristics of cheese made with
362 sheep milk. Int. Dairy J. 18:93-98.
- 363 International Organization for Standardization (ISO). UNE-ISO 4121-2006. Sensory
364 Analysis-Guidelines for the Use of Quantitative Response Scales; ISO: Geneva,
365 Switzerland.
- 366 ISO 1973. ISO in meat and meat product-determination of moisture content method
367 1442. Geneva. ISO.
- 368 Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of
369 bacteriophage T4. Nature, 227:680-685.

- 370 Macedo, I. Q., C. J. Faro, and E. V. Pires. 1993. Specificity and kinetics of the milk-
371 clotting enzyme from Cardoon (*Cynara cardunculus*, L.) toward bovine *k*-
372 casein. *J. Agric. Food Chem.* 41:1537-1540.
- 373 Macedo, A. C., and F. X. Malcata. 1996. Changes in the major free fatty acids in Serra
374 cheese throughout ripening. *Int. Dairy J.* 6:1087-1097.
- 375 Martins, A. P. L., M. M. P. Vasconcelos, and R. B. Sousa. 1996. Thistle (*Cynara*
376 *cardunculus*, L.) flower as a coagulant agent for cheesemaking: sort
377 characterization. *Lait*, 76:437-477.
- 378 Mas Mayoral, M., J. González Crespo, and M. J. Nieto Villaseca. 1991. Casar cheese:
379 production, physicochemical and microbiological characteristics. *Arch. Zootec.*
380 40:359-369.
- 381 Netherlands Standard NEN 3059. 1969. Butyrometric determination of the fat content
382 of cheese (Gerber-Van Gulik method). *Neth. Milk Dairy J.* 23:214-220.
- 383 Ordiales, E., A. Martín, M. J. Benito, A. Hernández, S. Ruíz-Moyano, and M. G.
384 Córdoba. 2012. Technological characterisation by free zone capillary
385 electrophoresis (FZCE) of the vegetable rennet (*Cynara cardunculus*) used in
386 “Torta del Casar” cheese-making. *Food Chem.* 133:227-235.
- 387 Park, Y. W. 2007. Rheological characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant*
388 *Res.* 68:73-87.
- 389 Pintado, A. I., T. G. Tavares, F. K. Tavaira, and F. X. Malcata. 2010. Tradition versus
390 modernism in cheesemaking technology: a Portuguese case study encompassing
391 plant coagulant, non-bovine milks and adventitious microflora. *Aust. J. Dairy*
392 *Technol.* 65:128-134.

- 393 Ramalho- Santos, M., P. Veríssimo, C. Faro, and E. Pires. 1996. Action on bovine α_{s1} -
394 casein of cardosins A and B, aspartic proteinases from the flowers of the
395 cardoon *Cynara cardunculus* L. Biochim. Biophys. Acta 1297:83-89.
- 396 Regulation (CE) 1491/2003 of European Commission of 25 of August: Registration of
397 the Protected Designation of Origin “Torta del Casar” in the Register of
398 Protected Designations of Origin and the Protected Geographic Indications.
- 399 Roa, I., M. B. López, and F. J. Mendiola. 1999. Residual clotting activity and ripening
400 properties of vegetable rennet from *Cynara cardunculus* in La Serena cheese.
401 Food Res. Int. 32:413-419.
- 402 Sanjuán, E., R. Millán, P. Saavedra, M. A. Carmona, R. Gómez, and J. Fernández-
403 Salguero. 2002. Influence of animal and vegetable rennet on the
404 physicochemical characteristics of Los Pedroches cheese during ripening. Food
405 Chem. 78:281-289.
- 406 Shammet, K. M., R. J. Brown, and D. J. McMahon. 1992. Proteolytic activity of some
407 proteinases on macropeptides isolated from κ -casein. J. Dairy Sci. 75:1380-
408 1388.
- 409 Silva, S. V. and F. X. Malcata. 1999. On the activity and specificity of cardosin B, a
410 plant proteinase on ovine caseins. Food Chem. 67:373 – 378.
- 411 Silva, S. V., T. Allmere, F. X. Malcata, and A. Andrén. 2003. Comparative studies on
412 the gelling properties of cardosins extracted from *Cynara cardunculus* and
413 chimosin on cow’s skim milk. Int. Dairy J. 13:559-564.
- 414 Sousa, M. J. C. F. 1993. Plant Rennet Substitute from Flowers of *Cynara cardunculus*.
415 M. Sc. Thesis, National University of Ireland Cork.

- 416 Sousa, M. J., and F.X. Malcata.1997. Ripening of ovine milk cheeses: Effects of plant
417 rennet, pasteurization, and addition of starter on lipolysis. Food Chem. 59:427-
418 432.
- 419 Sousa, M. J., and F. X. Malcata. 1998. Proteolysis of ovine and caprine caseins in
420 solution by enzymatic extracts from flowers of *Cynara cardunculus*. Enzyme
421 Microb. Technol. 22:305-314.
- 422 Tavaira, F. K., and F. X. Malcata. 1998. Microbiological characterization of Serra da
423 Estrela cheese throughout its AOP region. J. Food Protect. 61:601-607.
- 424 Tavarria F. K., M. J. Sousa, and F. X. Malcata. 2001. Storage and lyophilization effects
425 of extracts of *Cynara cardunculus* on the degradation of ovine and caprine
426 caseins. Food Chem. 72:79 – 88.
- 427 Tavaira, F. K., and F. X. Malcata. 2003. Enzyatic activities of non-starter lactic acid
428 bacteria isolated from a traditional Protuguese cheese. Enzyme Microb Technol.
429 33:236-243.
- 430 Tunick, M. H. 2000. Rheology of dairy foods that gel, stretch, and fracture. J. Dairy Sci.
431 83:1892-1898.
- 432 Valdés, B., S. Talavera, and E. Fernández-Galiano. 1987. Flora vascular de Andalucía
433 Occidental. Barcelona. Ketres Editora, S.A.
- 434 Veríssimo, P., C. Esteves, C. Faro, and E. Pires. 1995. The vegetable rennet of *Cynara*
435 *cardunculus* L. contains two proteinases with chymosin and pepsin-like
436 specificities. Biotechnol. Lett., 17:621 – 626.
- 437 Veríssimo, P., C. Faro, A. J. Moir, Y. Lin, J. Tang, and E. Pires. 1996. Purification,
438 characterization, and partial amino acid sequencing of two new aspartic
439 proteinases from fresh flowers of *Cynara cardunuculus*, L. Eur. J. Biochem.
440 235:762 – 768.

442 Figure 1 Evolution of pH and moisture (A), microbial counts for TVC, LAB and GPCP
443 cocci, (B) and hardness, adhesiveness, cohesiveness, and area F-T 2:3 (C) of
444 manufactured cheeses throughout their ripening period.

445

446 Figure 2 Principal component analysis of the descriptive sensory attributes, overall
447 scores, texture parameters of cheeses, and technological properties of vegetable rennets.

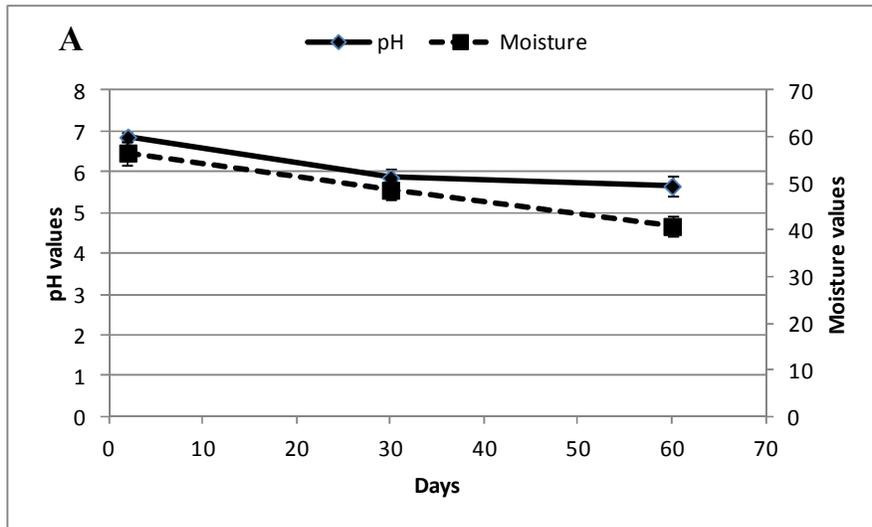
448 Sensory descriptors: spreadability (SD3), softness (SD4), viscosity (SD6), juiciness
449 (SD7), creaminess (SD5); Overall acceptability (SH1); Clotting activities: after 1h of
450 maceration (CA1), after 24h of maceration (CA24); Proteolytic activity against β -casein
451 (PAb), α -casein (PAa), κ -casein (PAk); Texture spreadability analysis: firmness (TS1),
452 work of shear (TS2), stickiness (TS3), work of adhesion (TS4); Texture compression
453 analysis: adhesiveness (TC1), cohesiveness (TC2), Area F-T 2:3 (TC3), hardness
454 (TC4).

455

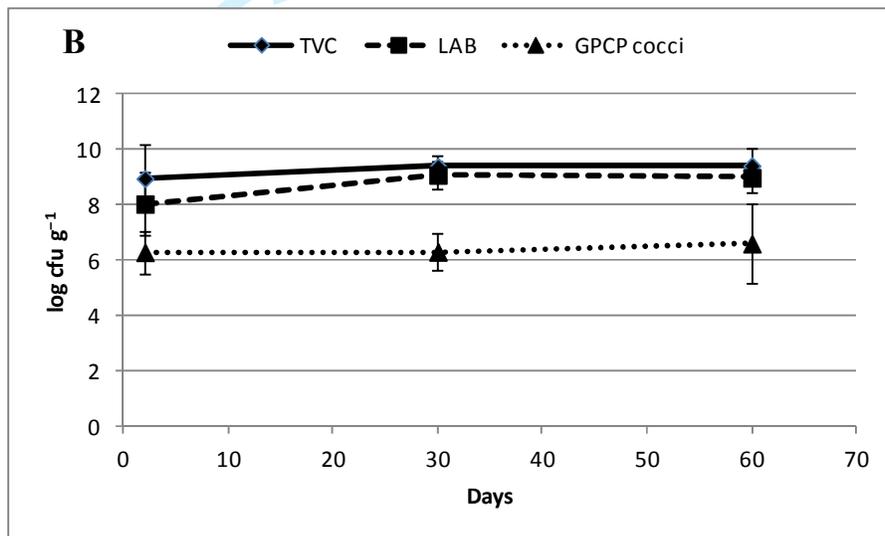
456 Figure 3 Scatter plot of measured versus predicted values of attribute creaminess of
457 cheeses derived from the PLSR analysis of the α -casein degradation and the κ -casein/ β -
458 casein degradation ratio of vegetable rennets.

459

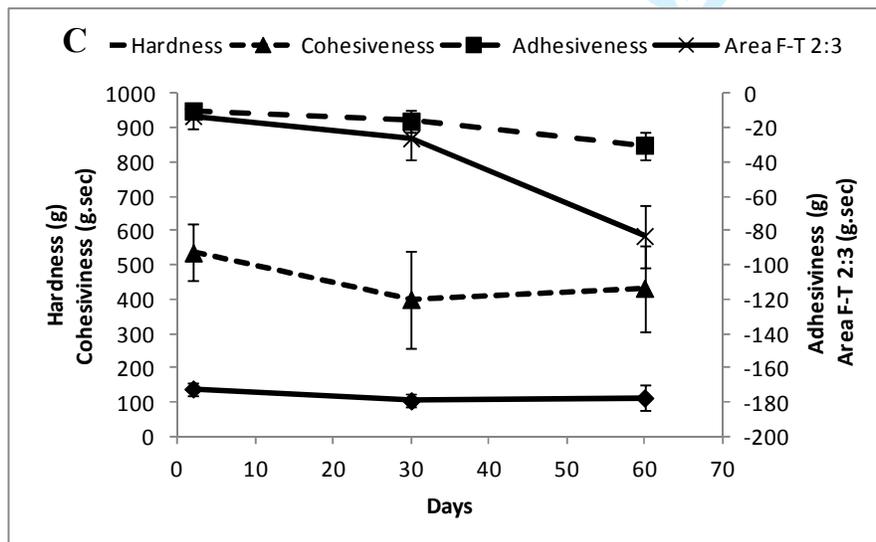
460 Figure 1



461



462



463

Figure 2

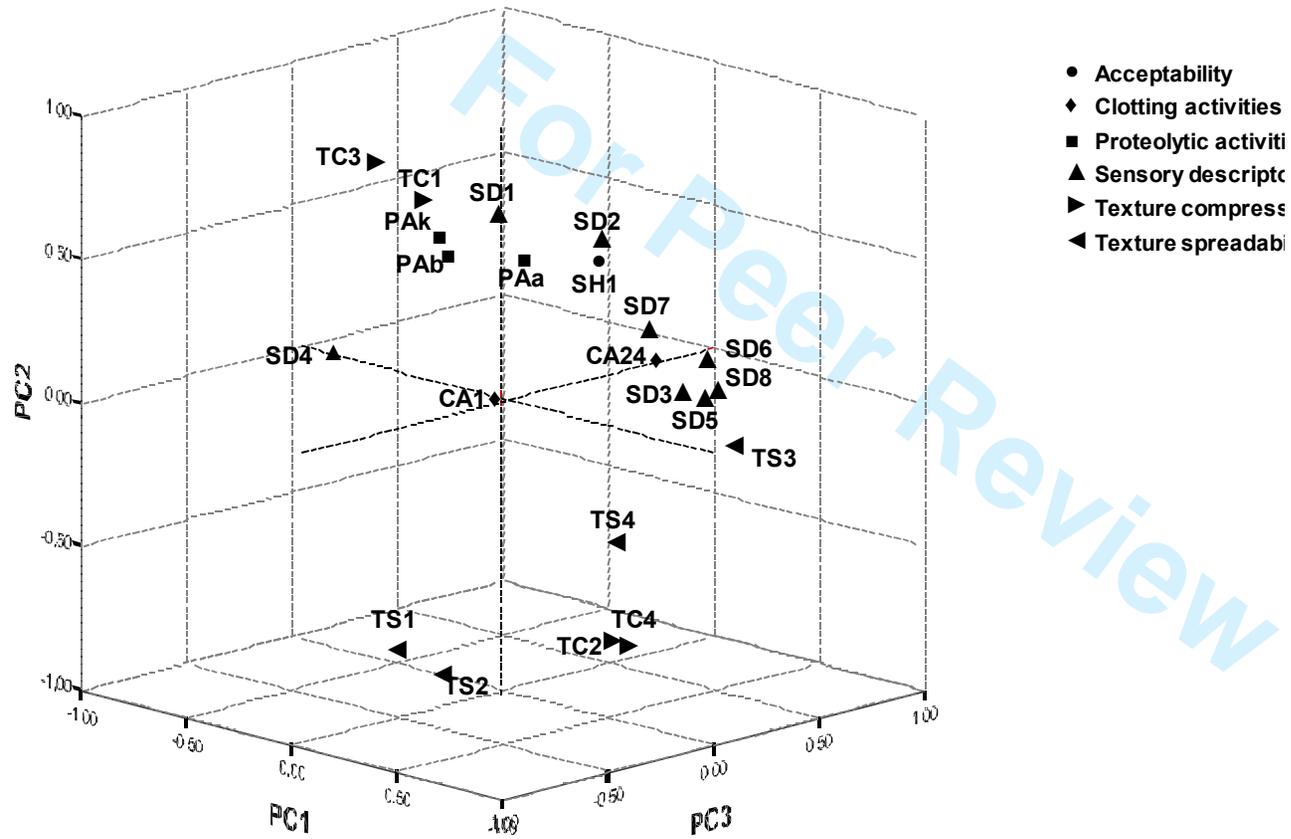
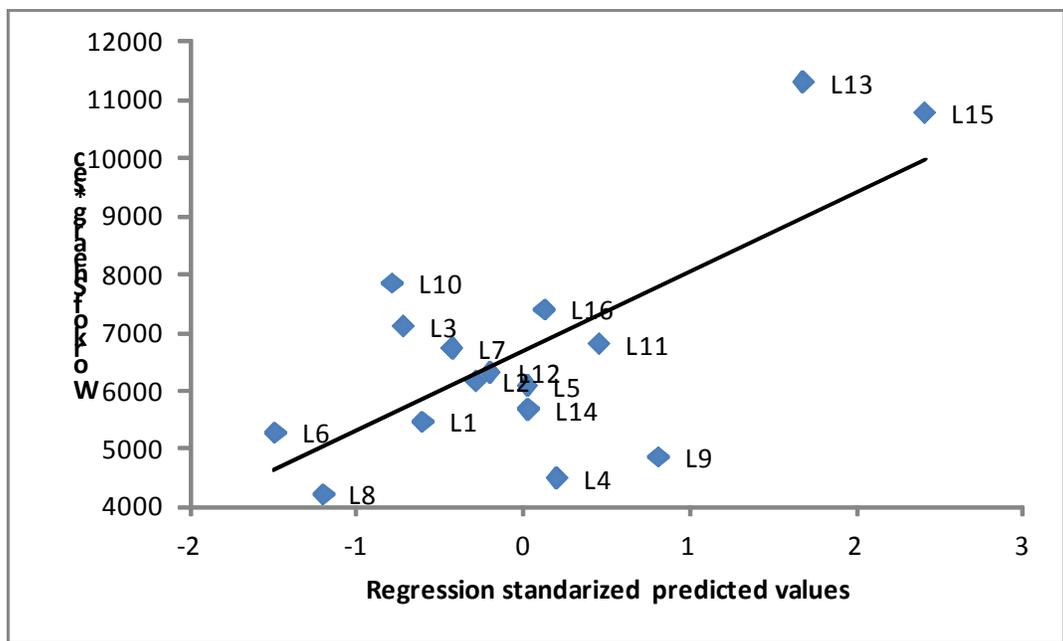


Figure 3



Peer Review

Table 1. Technological characteristics of the *Cynara cardunculus* rennets for cheese batch manufacture.

Sample	Maturation stage ¹	Localization ²	Clotting activity (RU)		Proteolytic activity (%)		
			24 h	1 h	α -casein	β -casein	k-casein
M1	b	L2	0.188	0.170	100	83.61	91.67
M2	a	L3	0.193	0.128	88.83	69.08	80.48
M3	b	L2	0.136	0.117	100	75.64	100
M4	c	L6	0.512	0.164	71.10	41.21	98.43
M5	b	L4	0.165	0.128	89.19	71.78	87.48
M6	c	L6	0.138	0.135	57.47	47.56	47.93
M7	b	L1	0.170	0.137	88.24	67.61	90.25
M8	c	L6	0.359	0.155	94.05	47.06	95.44
M9	c	L3	0.161	0.185	74.08	65.99	24.06
M10	c	L1	0.156	0.115	94.60	56.94	87.92
M11	c	L3	0.243	0.128	90.55	74.97	21.79
M12	a	L3	0.148	0.092	81.53	56.07	71.04
M13	c	L5	0.230	0.171	53.06	10.09	4.21
M14	b	L4	0.163	0.095	82.93	55.23	54.17
M15	a	L3	0.218	0.146	24.39	4.32	9.01
M16	b	L4	0.149	0.131	92.79	91.55	54.24

¹ a: flower is opening, only some styles and stigmas are visible; b: flower fully open, even with pollen; c: flower begins to dry, so some styles and stigmas are brownish.

² Geographic coordinates: L1: 38° 54' 8.82" N 6° 43' 59.9" W, L2: 38° 50' 34.8" N 6° 57' 39.73" W, L3: 38° 45' 6.73" N 6° 48' 10.42" W, L4: 38° 57' 0.30" N 6° 16' 53.03" W, L5: 38° 53' 59.94" N 6° 51' 12.43" W, L6: 38° 56' 32.78" N 6° 20' 23.16" W, L7: 38° 54' 23.54" N 6° 47' 37" W.

Table 2. Descriptive statistics of the physicochemical parameters of the cheese batches studied at 2 days of ripening, and correlations with technological properties of the vegetable rennets used.

Physicochemical parameters	Descriptive Statistics					Correlations				
						Clotting activity (R.U.) after maceration		Degradation of caseins		
	N	Mean	SD	Min	Max	24h	1h	α -caseins	β -casein	κ -casein
<i>Moisture</i>	16	56.61	2.56	52.90	62.99	-0.154	-0.357	-0.096	0.018	-0.310
<i>pH</i>	16	6.85	0.12	6.62	6.99	0.038	0.165	0.577*	0.528*	0.570*
<i>a_w</i>	16	0.97	0.01	0.96	0.99	-0.135	0.274	0.289	0.264	0.558*
<i>Protein (%)</i>	16	16.72	1.13	15.29	19.32	0.235	0.696**	-0.183	0.002	-0.178
<i>Fat (%)</i>	16	25.31	2.47	19.69	29.43	0.098	0.131	0.117	-0.156	0.361
<i>Cutting time (min)</i>	16	54.25	10.69	35.00	75.00	-0.480+	-0.090	0.712**	0.576*	0.702**
<i>Yield (%)</i>	16	23.8	2.0	21.0	27.0	-0.254	0.135	0.368	0.309	0.484+

+P<0.1

* P<0.05.

** P<0.01.

IV.3.2. Proteolysis effect of *Cynara cardunculus* rennet from different plant selected for being used in the elaboration of “Torta del Casar” cheese.

Enviado a la revista “Food Control”

Elsevier Editorial System(tm) for Food Control
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Proteolytic effect of *Cynara cardunculus* rennet from different plants selected for use in the elaboration of "Torta del Casar" cheese

Article Type: Research Article

Keywords: Torta del Casar, *Cynara cardunculus* L., proteolysis, biogenic amines, sensorial.

Corresponding Author: Dr. Maria Jose Benito,

Corresponding Author's Institution: Universidad de Extremadura

First Author: Elena Ordiales

Order of Authors: Elena Ordiales; Maria Jose Benito; Alberto Martin; Margarita Fernández; Alejandro Hernández; Maria G Ordiales

Abstract: The purpose of this work was to analyze the influence of rennet from different *C. cardunculus* plants, selected for its clotting and proteolytic activity on caseins, on the characteristics of manufactured "Torta del Casar" cheeses. After classifying the cardoon according to its proteolytic activity into five groups of greater or lesser activity, 16 batches of cheeses were made with rennet derived from different wild cardoon plants. We observed a major development of the proteolysis during ripening leading to the generation of non-protein nitrogen compounds. Especially noteworthy was the relationship of AN generation with rennet clotting activity after 24 hours of maceration, and the fact that the production of biogenic amines was not related to the proteolytic activity of the rennet. The activities of the rennet observed "in vitro" were also developed "in vivo" in the cheeses, with the different rennets used affecting the final sensory characteristics of cheeses. The rennet with high clotting activity at 24 h was positively correlated with the creaminess, viscosity, and acceptability of the cheese. However, the high proteolytic activity rennet negatively influenced the acidity, bitterness, and creaminess parameters. Therefore the most appropriate cardoons for making this cheese are those with higher clotting activities and moderate proteolytic activities especially on β -casein. The use of controlled and characterized cardoons in the manufacturing process of "Torta del Casar" is fundamental to obtaining the homogeneous product demanded by the "Torta del Casar" Registry of the Protected Designation of Origin.

Suggested Reviewers: Lourdes Cabezas
bt1carem@uco.es

They work with this kind of cheeses and proteolysis

Jose Fernandez Salguero
ao1fecaj@lucano.uco.es

F. Xavier Malcata
xmalcata@esb.ucp.pt



ESCUELA DE INGENIERIAS AGRARIAS

NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

Carretera de Cáceres s/n
06071-Badajoz (Spain)
Teléfono: +34 924 286200 ext 86270
Fax: +34 924 286201
E-MAIL: mjbenito@unex.es

4 July 2012

Please find enclosed the manuscript entitled “**Proteolytic effect of *Cynara cardunculus* rennet from different plants selected for use in the elaboration of “Torta del Casar” cheese**” to be considered for publication in the *Food Control*.

Mailing address: Nutrición y Bromatología. Escuela de Ingenierías Agrarias. Universidad de Extremadura. 06071-Badajoz. Spain.

Phone: 0034 924 286200 ext 86270. Fax: 0034 924286201.

E-mail: mjbenito@unex.es

Authors:

Elena Ordiales (Centro Tecnológico Agroalimentario Extremadura (CTAEX))

María J. Benito (University of Extremadura, Spain)

Alberto Martín (University of Extremadura, Spain)

Margarita Fernández (University of Extremadura, Spain)

Alejandro Hernández (University of Extremadura, Spain)

María de Guía Córdoba (University of Extremadura, Spain)

In this manuscript the objective was to analyze the influence of rennet from different *C. cardunculus* plants, selected for its clotting and proteolytic activity on caseins, on the characteristics of manufactured “Torta del Casar” cheeses. After classifying the cardoon according to its proteolytic activity into five groups of greater or lesser activity, 16 batches of cheeses were made with rennet derived from different wild cardoon plants. We observed a major development of the proteolysis during ripening leading to the generation of non-protein nitrogen compounds. Especially noteworthy was the relationship of AN generation with rennet clotting activity after 24 hours of maceration, and the fact that the production of biogenic amines was not related to the proteolytic activity of the rennet. The activities of the rennet observed “in vitro” were also developed “in vivo” in the cheeses, with the different rennets used affecting the final sensory characteristics of cheeses. The rennet with high clotting activity at 24 h was positively correlated with the creaminess, viscosity, and acceptability of the cheese. However, the high proteolytic activity rennet negatively influenced the acidity, bitterness, and creaminess parameters. Therefore the most appropriate cardoons for making this cheese are those with higher clotting activities and moderate proteolytic activities especially on β -casein. The use of controlled and characterized cardoons in the manufacturing process of “Torta del Casar” is fundamental to obtaining the homogeneous product demanded by the “Torta del Casar” Registry of the Protected Designation of Origin.

Yours sincerely,

María José Benito

Research Highlights

Authors analyze the influence of *C. cardunculus* rennet, selected for its clotting and proteolytic activity, on the characteristics of "Torta del Casar". The appropriate cardoons for making this cheese were those with higher clotting and moderate proteolytic activities. The use of controlled and characterized cardoons is fundamental to obtaining the homogeneous product demanded by the "Torta del Casar" Registry of the Protected Designation of Origin.

1 **Proteolytic effect of *Cynara cardunculus* rennet from different**
2 **plants selected for use in the elaboration of “Torta del Casar”**
3 **cheese**

4 Ordiales, E.^a; Benito, M.J.^{b*}; Martin, A.^b, Fernández, M.^b; Hernández, A.^b;
5 Córdoba, M.G.^b

6

7 ^a Agricultura, Centro Tecnológico Agroalimentario Extremadura (CTAEX), Ctra.
8 Villafranco a Balboa Km. 1.2, Villafranco del Guadiana, 06195 Badajoz, Spain

9 ^b Nutrición y Bromatología, Escuela de Ingenierías Agrarias, Universidad de
10 Extremadura, Ctra. de Cáceres s/n, 06071 Badajoz, Spain

11

12

13

14 *Corresponding author

15 Tel.: +34 924 286200; fax: +34 924 286201

16 E-mail address: mjbenito@unex.es

17 <http://eia.unex.es>

18

19 ABSTRACT

20 The purpose of this work was to analyze the influence of rennet from
21 different *C. cardunculus* plants, selected for its clotting and proteolytic activity on
22 caseins, on the characteristics of manufactured “Torta del Casar” cheeses. After
23 classifying the cardoon according to its proteolytic activity into five groups of
24 greater or lesser activity, 16 batches of cheeses were made with rennet derived
25 from different wild cardoon plants. We observed a major development of the
26 proteolysis during ripening leading to the generation of non-protein nitrogen
27 compounds. Especially noteworthy was the relationship of AN generation with
28 rennet clotting activity after 24 hours of maceration, and the fact that the
29 production of biogenic amines was not related to the proteolytic activity of the
30 rennet. The activities of the rennet observed “*in vitro*” were also developed “*in*
31 *vivo*” in the cheeses, with the different rennets used affecting the final sensory
32 characteristics of cheeses. The rennet with high clotting activity at 24 h was
33 positively correlated with the creaminess, viscosity, and acceptability of the
34 cheese. However, the high proteolytic activity rennet negatively influenced the
35 acidity, bitterness, and creaminess parameters. Therefore the most appropriate
36 cardoons for making this cheese are those with higher clotting activities and
37 moderate proteolytic activities especially on β -casein. The use of controlled and
38 characterized cardoons in the manufacturing process of “Torta del Casar” is
39 fundamental to obtaining the homogeneous product demanded by the “Torta del
40 Casar” Registry of the Protected Designation of Origin.

41

42 **Keywords:** Torta del Casar, *Cynara cardunculus* L., proteolysis, biogenic
43 amines, sensorial.
44

45 Introduction

46 Proteolysis in cheese during ripening plays a vital role in the development
47 of texture and flavour, and has been the subject of several reviews (Fox &
48 McSweeney, 1996). Proteolysis contributes to textural changes of the cheese
49 matrix, due to breakdown of the protein network, decrease in a_w through water
50 binding by liberated carboxyl and amino groups, and increase in pH, which
51 facilitates the release of sapid compounds during mastication. It contributes
52 directly to flavour and to off-flavour (e.g., bitterness) of cheese through the
53 formation of peptides and free amino acids as well as liberation of substrates
54 (amino acids) for secondary catabolic changes, i.e., transamination, deamination,
55 decarboxylation, desulfuration, catabolism of aromatic amino acids, and reactions
56 of amino acids with other compounds (Sousa et al., 2001). However, proteolysis
57 can also produce biogenic amines (BAs) in high amounts through the activity of
58 amino acid decarboxylases. Excessive consumption of these amines can be a
59 health concern because their unbalanced uptake by the human organism can
60 generate diseases of different degrees of severity due to their action on the
61 nervous and gastrointestinal systems, and on blood pressure.

62 The high quality Spanish cheese “Torta del Casar” is produced in the
63 Extremadura region, in the south-west of Spain, and is characterized by its soft
64 and buttery texture, yellowish-coloured paste, intense flavour, and its peculiar,
65 slightly bitter taste. It is made from whole raw ewe’s milk by enzymatic clotting
66 using as coagulant an aqueous extract of dried wild cardoon (*Cynara*
67 *cardunculus*) flowers (Macedo, Faro, & Pires, 1993). This cheese is a marketed
68 under the Registry of the Protected Designation of Origin “Torta del Casar”

69 (Casar de Cáceres, Cáceres, Spain) in accordance with the Regulations (CE)
70 1491/2003 of the European Commission.

71 Extracts of *C. cardunculus* are reported to contain two proteinases,
72 cardosin A and cardosin B (Sousa, 1993; Verissimo, Esteves, Faro, & Pires,
73 1995; Verissimo, Faro, Moir, Lin, Tang, & Pires, 1996). Cardosins are
74 characterized by high milk-clotting activity (Macedo, Faro, & Pires, 1993; Sousa &
75 Malcata, 1998) and also display a strong proteolytic action *in vitro*, which
76 eventually leads to extensive breakdown of the caseins in the cheese matrix
77 (Macedo & Malcata, 1996), producing cheese characterized by a soft buttery
78 texture and the development of a typical aroma and a slightly piquant and creamy
79 flavour (Galán, Prados, Pino, Tejeda, & Fernández-Salguero, 2008). Aqueous
80 extracts of cardoon flowers have been used for centuries as rennets in traditional
81 ewe's milk cheesemaking in the Iberian Peninsula (Roseiro, Barbosa, Ames &
82 Wilbey, 2003).

83 These traditional aqueous extracts are made from flowers of diverse *C.*
84 *cardunculus* plants harvested at different flower ripening stages and mixed with
85 other parts of the plant. Hence, the milk clotting activity of the flowers shows great
86 heterogeneity in their use for of the rennet used in "Torta del Casar" manufacture.
87 This fact has a negative influence on the cheese's quality parameters, including
88 low yield, and lack of homogeneity of relevant sensorial factors between batches,
89 such as texture parameters. Thus, the technological quality control of the
90 aqueous extracts used as rennet would be desirable for standardization of the
91 cheese-making process.

92 The aim of this work was to analyze the influence of different *C.*
93 *cardunculus* populations, characterized by their clotting and proteolytic activity
94 against caseins, on the characteristics of manufactured “Torta del Casar”
95 cheeses.

96

97 **Materials and Methods**

98 *2.1. Plant material*

99 Samples of cardoon (*Cynara cardunculus*, L.) used in this study were
100 identified in accordance with the guidelines of Valdés, Talavera, & Fernández-
101 Galiano (1987). Sixteen plants were collected from different locations during the
102 seasons of the years 2007 and 2008 (Ordiales, Martín, Benito, Hernández, Ruíz-
103 Moyano, & Córdoba, 2012). The collected flowers were dried and kept in a cool
104 dry place until use.

105 *2.2. Milk-clotting activity assays*

106 For the milk-clotting assays, 0.5 g of each cardoon sample was softened in
107 75 ml of ultrapure water for 1 and 24 h. The rennet clotting time of these
108 coagulant extracts was measured according to a standard method (NILACTM;
109 NIZO, Ede, The Netherlands) described by Tavaría, Sousa, & Malcata (2001).
110 The substrate was prepared by dissolving 12 g of low-heat bovine skimmed milk
111 powder in 100 mL of 0.01 M CaCl₂ (pH 6.5) at 30°C. The enzymatic assay was
112 performed using 0.2 mL of coagulant extract added to 2 mL of reconstituted skim
113 milk, and the clotting time was determined by visual inspection. One rennet unit

114 (R.U.) was defined as the amount of crude enzyme extract needed to coagulate
115 10 mL of reconstituted low-heat processed skim milk at 30°C in 100 s (FIL-IDF
116 157/1992). Determinations were quadruplicated, and the mean of each set of four
117 data was taken as the datum point.

118 2.3. *"In vitro" casein proteolytic activity*

119 The dried flower extracts were prepared by macerating 0.25 g of dried
120 flowers in 5 mL of water (corresponding to a proportion of 50 g in 1 L) at room
121 temperature for 4 h. The homogenate was filtered through a Whatman filter No. 4.
122 The substrate used for degradation by the extracts consisted of a mix of bovine
123 caseins (Sigma Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) (α , β , and κ), at a
124 concentration of 0.5 mg/mL of each casein, dissolved in 5 ml of distilled water.
125 The dried flower extracts were macerated with the casein mix, at 2.5% of extract
126 (v/v), for 2 h at room temperature to allow casein degradation. After this time the
127 extracts with degraded caseins were denatured by adding 30 μ L of SDS-PAGE
128 loading buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 20% (w/v) glycerol, 2% (w/v) SDS, 5%
129 (w/v) β -mercaptoethanol, 0.025% (w/v) bromophenol blue) and incubated at 99°C
130 for 5 min.

131 The electrophoresis conditions were those described by Laemmli (1970),
132 and the concentrations of acrylamide (29:1 acrylamide/bisacrylamide) in the gels
133 were 4% (w/v) for stacking gels and 15% (w/v) for separating gels. Gels were
134 cast and run in a Miniprotean III device (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA).
135 The molecular mass marker kits (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) contained
136 proteins from 6.5 to 205 kDa. The gels were subsequently stained with 0.5%

137 (w/v) Coomassie blue (G-250) dissolved in 45% (v/v) water, 45% (v/v) methanol,
138 and 10% (v/v) acetic acid for 30 min, and destained with a solution consisting of
139 20% (v/v) methanol, 10% (v/v) acetic acid, and 70% (v/v) distilled water for 4 h. A
140 computer image analysis program (Genetools, Synoptics Ltd., Cambridge, U.K.)
141 was used for the densitometric analysis of the gel electrophoresis.

142

143 2.4. *"Torta del Casar" cheese-making procedure*

144 A total of sixteen different batches of "Torta del Casar" were manufactured,
145 of 10 cheeses each batch, from unpasteurized Merino ewe's milk to which no
146 starter cultured was added. Each batch was clotted using different *C. cardunculus*
147 *L.* rennets, corresponding to the 16 plants collected as before. The aqueous
148 extracts from the cardoon *C. cardunculus L.* were prepared from 50 g of dried
149 flowers in 1 L of water, leaving them to macerate for 24 h, and adding 10 mL of
150 this extract per litre of milk at 28–30°C, for each 32 L batch. After pressing, the
151 cheeses were immersed in a salt solution (16 % (w/v) NaCl) for 4 hours. The
152 ripening took place at a temperature of 5–10°C and relative humidity of 85–90 %
153 throughout the ripening period of 60 days. Three cheeses of each batch were
154 randomly taken for analysis after 2, 30, and 60 days of ripening.

155

156 2.5. *Physicochemical analysis*

157 The weight losses of the cheeses were measured through the differences
158 of consecutives weights from the initial weight to the final weight at day 60 of

159 ripening. The pH was measured using a Crison mod. 2002 pH meter (Crison
160 Instruments, Barcelona, Spain). Total protein was determined by the Kjeldahl
161 method (International Dairy Federation (IDF), 1993), with a Kjelttec system 1002
162 distilling unit (Tecator, Hoganas, Sweden).

163 The yield was determined as the quantity of cheese obtained per volume
164 of milk, expressed in %. The cutting time is the time needed for curd to form, from
165 when the rennet is added to when the curd is cut.

166

167 *2.6. Microbial counts*

168 For the microbial counts and isolates, 10 g aliquots of each cheese sample were
169 taken aseptically, transferred to sterile plastic pouches, 10-fold diluted with 1%
170 peptone water (Pronadisa, Alcobendas, Madrid, Spain), and homogenized for
171 120 s using the laboratory Stomacher Lab-Blender 400 (Seward Lab., London,
172 England). Serial 10-fold dilutions were prepared from the same solution and
173 inoculated onto agar plates.

174 Plate count agar (PCA, Oxoid) was used for mesophilic aerobic bacteria counts at
175 30°C for 48 h and for psychrotrophs for 7 days at 7°C. LAB were grown in MRS
176 agar (Oxoid) of which the pH was adjusted to 5.6 with acetic acid (10%),
177 incubating at 37°C for 2 days under anaerobic conditions. The *Staphylococcus*
178 counts were determined in Baird Parker agar (BP; Oxoid) supplemented with
179 potassium tellurite and egg yolk emulsion at 37°C for 48 h, and black colonies
180 were counted.

181

182 *2.7. Analysis of whey and casein proteins*

183 *2.7.1. Preparation of whey and casein protein extracts*

184 The whey protein fractions were extracted from cheese as described in the
185 literature (Enne, Elez, Fondrini, Bonizzi, Feligini, & Aleandri, 2005). Samples (20
186 g) were homogenized (2 cycles of 1 min each) in doubly distilled water (30 ml)
187 with an Ultraturrax homogenizer (Ika®-Werke, Staufen, Germany). Since this step
188 is heat-producing, a strict time optimization was required to avoid whey protein
189 degradation. The homogenized samples were skimmed by centrifugation (2000 ×
190 g for 15 min at 4 °C). Casein was precipitated at its isoelectric point by adding 1M
191 hydrochloric acid and centrifuging at 2500 × g for 10 min at 4°C.

192 Caseins were obtained from 1g of cheese samples by precipitation at pH 4.3, by
193 the addition of 10 ml of 1 M ammonia–acetate buffer at 8°C for 20 min (Veloso,
194 Teixeira, Peres, Mendonça, & Ferreira, 2004). Then the samples were centrifuged
195 for 15 min at 3000 g at 4°C to recover the precipitated caseins. The caseins were
196 dispersed in 10 ml of 1 mM ammonia–acetate buffer (pH 4.3), precipitated again,
197 and centrifuged for 10 min at 3000 g at 4°C. This procedure was repeated twice.
198 In order to eliminate the remaining fat, the sample was washed with 5 ml acetone
199 and left to dry at room temperature. Finally, the dried powdered casein was
200 stored at -80°C until analysis.

201

202 *2.7.2. Protein concentration and polyacrylamide gels (SDS and UREA PAGE)*

203 The protein concentration was determined following the Bradford method using
204 100 µl of the soluble protein extracts.

205 Whey protein hydrolysis was detected by SDS-PAGE (Mini-PROTEAN 3 system,
206 Bio-Rad, Hercules, CA). For this, whey protein extracts were electrophoresed
207 using 4% acrylamide in stacking gels and 15% acrylamide in separating gels.

208 Samples (15 µl) were denatured by boiling for 5 min in 0.0625 M Tris–HCl buffer
209 at pH 6.8 with 20% glycerol, 2% SDS, and 5% 2-mercaptoethanol. A molecular
210 weight marker from 205 kDa to 6.5 kDa (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA)
211 was used as standard. The potential was kept constant at 90 mV for the stacking
212 gel and at 150 mV for the separating gel. Proteins were visualized by Coomassie
213 brilliant blue R-250 staining (0.25% (w/v), in 50% (v/v) methanol and 10% (v/v)
214 acetic acid). The excess stain was washed out by destaining with a solution of
215 20% (v/v) methanol and 5% (v/v) acetic acid. A computer image analysis program
216 (Genetools, SynGene, Cambridge, United Kingdom) was used for the
217 densitometric analysis of the gels.

218 Casein protein hydrolysis was detected by UREA-PAGE. Casein protein extracts
219 were electrophoresed using 4% acrylamide in stacking gels and 12% acrylamide
220 in separating gels. The stacking gel buffer was 0.06 M
221 tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris), 8 M urea at pH 6.8, and the separating
222 gel buffer was 0.76 M Tris, 8 M urea at pH 8.8. The electrophoresis buffer was a
223 solution of 0.02 M Tris, 0.19 M glycine. Samples (5 µl) were denatured by boiling
224 for 5 min in 0.0625 M Tris–HCl buffer at pH 6.8 with 10 M urea, 20% glycerol, and
225 5% 2-mercaptoethanol. Standard proteins α , β , and κ caseins (Sigma Chemical,
226 St. Louis, MO, USA) were used as standard. A computer image analysis program
227 (Genetools, SynGene, Cambridge, United Kingdom) was used for the
228 densitometric analysis of the gels. Electrophoresis was developed as above.

229

230 *2.8. Non-protein nitrogen and amino acid nitrogen analysis*

231 Non-protein nitrogen (NPN) was determined by the Nessler method using 4 g of
232 sample after protein precipitation with 0.6 M perchloric acid. Amino acid nitrogen

233 (AN) was determined from the 0.6 M perchloric acid protein precipitation fraction
234 after peptide precipitation with 10% sulfosalicylic acid (Benito et al., 2005).

235

236 2.9. Biogenic amine production (BA)

237 & Pelikánová (1998). A 10 g sample
238 was homogenized and then shaken in a closed Erlenmeyer flask with 75 mL of
239 0.6 M HClO₄ for 1 h. The mixture was filtered through a filter paper, washed with
240 HClO₄ and the volume adjusted to 100 mL. In accordance with the expected
241 amine content, 5 mL of acidic extract was transferred to a test tube, the volume
242 adjusted to 5 mL with HClO₄, and then spiked with 125 µL of internal standard
243 solution (1,7-heptanediamine, 400 mg L⁻¹). The mixture was then made alkaline
244 by adding 1 mL of 9.8 M NaOH solution. After brief vortexing, 100 µL of pure
245 benzoyl chloride was added. The test tube was shaken for 2.5 min. Then it was
246 allowed to stand in the water bath of the laboratory ultrasound cleaner for 15–20
247 min. Subsequently 2.5 g of NaCl were shaken with the solution for 1 min. This
248 was followed by a two-step extraction with 3 mL of diethyl ether. Combined
249 extracts (1 ml in each step) were dried under a stream of hot air. The dry residue
250 was dissolved in 400 µL of methanol–water (1:1, v/v). The biogenic amines were
251 assayed by micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC) (Benito et al.
252 2007; Martín et al. 2007) using an automated PACE 5500 (Beckman Instrument
253 Inc., Palo Alto, CA, USA).

254

255 2.10. Sensory analysis

256 At the end of ripening, a quantitative descriptive analysis was performed by a
257 trained panel of 15 judges to evaluate differences in flavour and aroma

258 parameters. This procedure involved cutting slices approximately 0.5 cm thick.
259 Samples were three-digit coded, and the order of serving was determined by
260 random permutation. Two panel-replicates were carried out for each sample. The
261 response to each indicator was determined as the mean value of the panelist's
262 responses. In an additional hedonic test, a panel of 17 untrained consumers
263 evaluated the samples for overall acceptability.

264

265 2.11. Statistical analysis

266 For the cardoon plants' classification based on their *in vitro* casein proteolytic
267 activity, the hierarchical clustering method was employed, based on average
268 linkage using SPSS 15.0 (SPSS Inc Chicago, IL, USA). The statistical analysis of
269 the data was carried out using one-way analysis of variance, and the means were
270 separated by Tukey's honest significant difference test using SPSS for Windows,
271 15.0. The relationships between the enzymatic activities of the rennets and the
272 physicochemical parameters of the cheeses were evaluated by Pearson
273 correlation coefficients. A principal component analysis (PCA) was performed on
274 the enzymatic activities of the rennets and the physicochemical parameters of
275 cheeses at 2 days of ripening.

276

277

278 **Results and Discussion**

279 Figure 1 shows the results regarding the classification of the cardoon plants and
280 their proteolytic activity *in vitro*, indicating the clotting activity of each cluster. Five
281 clusters were obtained, with three supergroups of the cardoon plants classified as

282 very, moderately, or scarcely proteolytic, this last being the case of samples M13
283 and M15 (Fig. 1). The cardoon plants of cluster 1 are characterized by a strong
284 degradation of α - and κ -casein (84 and 81%, respectively), and moderately
285 degraded β -casein (54%). Cluster 2 groups cardoons with a moderate proteolytic
286 activity on β -casein (67%), and great intensity on α - and κ -casein (88 and 83%,
287 respectively). The cardoons in cluster 3 showed a moderate degradation of κ -
288 casein (54%), but intense degradation of α - and β -casein (93 and 92%,
289 respectively). The degradation of α -casein was intense (82%), of β -casein
290 moderate to high (70%) for cardoons of cluster 4, with κ -casein being degraded to
291 a lesser degree (23%). Finally, the cardoons of cluster 5 moderately degraded α -
292 casein (39%), and showed a very low proteolytic activity on β - (10%) and κ -
293 casein (9%).

294 After classifying the cardoons, 16 batches of cheeses were made with
295 rennet derived from the different cardoon plants. Figure 2 presents the principal
296 component analysis (PCA) of the proteolytic parameters of the cheeses at 2 days
297 of ripening with the clotting and proteolytic activity of the 16 cardoon rennets used
298 for the cheese making.

299 The first axis accounted for 35.25% of the variance and was mainly
300 defined by proteolysis parameters such as degradation of α -, β -, and κ -caseins,
301 and also by cutting time and yield of the cheeses at 2 days of ripening, with
302 positive correlations between the parameters. The second axis (PC 2; 14.33% of
303 the variance) was related to clotting activity of the rennets at 2 days of ripening.

304 Batches 1, 2, 3, 6, 7, 10, and 16 were positively related to the casein
305 degradation, cheese yield, and the cutting time of the curd. Batches 13 and 15
306 were negatively correlated with parameters as cheese yield, degradation of α -, β -,
307 and κ -casein, and the clotting time. The same trend was observed for batches 9
308 and 11, but to a lesser extent.

309 Thus, the cardoon plants that had high proteolytic activity *in vitro*, also
310 showed this activity in the cheeses. The contrary behavior was very evident for
311 those plants classified as scarcely proteolytic (M13 and M15). These cardoon
312 plants used as rennets will therefore have different effects on the development of
313 the sensorial characteristics of the cheeses.

314 Figure 3 shows the evolution of different parameters during processing.
315 The pH values ranged from 6.85 at the beginning of the ripening time to 5.65 at
316 60 days of ripening. The pH is of great importance in cheese ripening due to its
317 influence on the proteolytic activity. Proteolytic activity in cheese is determined
318 mainly by the levels and type of residual rennet, salt and moisture ratio,
319 temperature of ripening, and changes in pH during ripening (Lawrence, Creamer
320 & Gilles, 1987). Over the ripening time, we observed a decrease in cheese
321 weight, by 1.35% at 2 days of ripening, to 33.41% at the end of the period
322 studied.

323 The evolution of the microorganism counts during processing is shown in
324 Figure 3. Total aerobic mesophilic counts had increased from 9.3 to 10.4 log CFU
325 /g in the cheeses after 60 days of ripening in all batches, and from 8.2 to 9.3 for
326 psychrotrophs. Similar results have been found in other traditional cheeses.

327 Galán, Cabezas, & Fernández-Salguero (2012) worked with cheese elaborated
328 using powered plant coagulant (*C. cardunculus*) and found stable counts for total
329 viable organisms of 8.7 log CFU/g throughout ripening time.

330 With respect to LAB, all the batches showed a statistically significant
331 increase, reaching levels higher than 8 log CFU/g after 60 days, and for
332 staphylococci the counts stayed stable until the end of the process at levels
333 around 6.5 log CFU/g. This growth of LAB is coherent with the evolution of the pH
334 values during the processing. Stable levels of *Staphylococcus* sp. of 6.5 log
335 CFU/g were found throughout ripening time. In other work, micrococci and LAB
336 counts remained constant in cheeses elaborated using *C. cardunculus* coagulant,
337 with counts of 5.3 log CFU/g for micrococci, and 8.7 log CFU/g for LABs (Galán
338 et al., 2012).

339 Regarding the evolution of parameters related to proteolysis throughout
340 the cheese ripening (Table 1), caseins were degraded, with their content in the
341 cheese decreasing from 283.99 mg g⁻¹ at the beginning of the ripening process to
342 226.49 mg g⁻¹ at the end. As a consequence, the level of whey proteins in the
343 cheeses was higher at 60 days (262.27 mg g⁻¹) of ripening than at 2 days (171.23
344 mg g⁻¹). It seems that the whey protein content stabilized between 30 and 60
345 days of ripening time. The NPN and AN concentrations increased during ripening
346 due to the breakdown of caseins, from 2.05 at 2 days to 3.55 mg g⁻¹ at 60 days of
347 ripening for NPN, and from 0.59 mg/g to 1.63 mg/g for AN. Mas Mayoral,
348 González Crespo, & Nieto Villaseca (1991) recorded an increase in IP (NPN/NT)
349 from 3.94% at 3 d following manufacture to 13% at the end of ripening time for
350 "Torta del Casar" cheese. Sanjuán, Millán, Saavedra, Carmona, Gómez, &
16

351 Fernández-Salguero (2002) reported for “Los Pedroches” cheeses, manufactured
352 with vegetable (*C. cardunculus*) rennet, that TN values ranged from 5.92 g/100 g
353 at 2 days of ripening to 6.04 g/100 g DM at 60 days of ripening. Moreover, the
354 content of NPN and AN in these cheeses increased throughout the ripening
355 period. Similar results were obtained for “La Serena” cheese after 60 days of
356 ripening (Núñez, Fernández del Pozo, Rodríguez Martín, Gaya, & Medina, 1991).
357 Soluble nitrogen components at the beginning of the process in these cheeses
358 are produced mainly by the action of *Cynara cardunculus* proteases (Roa, López,
359 & Mendiola, 1999; Galán et al., 2012), although microorganisms are responsible
360 for proteolysis from the middle to the end of the process. The degradation of
361 water insoluble nitrogen, and therefore the production of water soluble nitrogen, is
362 mainly driven by residual rennet trapped in the cheese matrix, which hydrolyses
363 α -casein (Creamer & Olson, 1982; Dulley, 1974).

364 The results obtained for the protein content after two days of ripening were
365 positively correlated with coagulant activity (1 hour), with the higher the protein
366 content, the greater the coagulant activity (1 h). Among factors that affect milk
367 coagulation, casein concentration plays an important role (St-Gelais & Haché,
368 2005). Caron, St-Gelais, & Pouliot (1997) observed that coagulation was delayed
369 (long coagulation time) in milk with high protein content relative to milk with a low
370 protein concentration. Moreover, the casein content was negatively correlated
371 with coagulant activity (24 h) at 30 and 60 days of ripening, with the higher the
372 rennet clotting activity (24 h), the lower the content of casein at 30 and 60 days.
373 This is due to the greater degradation of caseins. Van Hekken and Holsinger
374 (2000) observed that rennet coagulation properties were related not only to

375 casein concentration but also to the proportion of α -casein and β -casein present
376 in the milks. In parallel with the evolution of the casein, the rennet coagulant
377 activity (24 h) influenced the AN content of the cheese at 30 and 60 days of
378 ripening. The correlation is positive, meaning that the greater the coagulant
379 activity (24 h), the greater the content of AN in the cheese at 30 and 60 days of
380 ripening due to the effect of the degradation of caseins.

381 The effect of proteolysis during processing is also shown in Figure 4 for the
382 UREA and SDS-PAGE gels. The casein profile evolved throughout ripening,
383 showing a gradual degradation of caseins (86% for α - casein and 74% for β -
384 casein) in all samples. Concomitant with this decrease in concentration of these
385 caseins was an increase of nitrogen compounds derived from proteins. The same
386 was the case for whey proteins, which decreased throughout the process, but
387 peptides deriving from casein hydrolysis appeared during the ripening.
388 Proteolysis, the ratio of β - to κ - caseins, has been used as a basis to classify
389 cheeses (Fox, 1993; Sousa, 2001). Macedo and Malcata (1996) studied the
390 hydrolysis of α - and β -caseins during the ripening of “Serra” cheese by
391 polyacrylamide gel electrophoresis. They observed that, by the end of ripening,
392 the α - and β -caseins had undergone extensive degradation, up to 82 and 76%,
393 respectively. However, other authors found that, while α -casein decreased
394 throughout ripening, β -casein only decreased slightly, confirming its greater
395 resistance to enzyme hydrolysis (Fernández-Salguero & Sanjuán, 1999). The
396 hydrolysis of β -caseins seems to be related to the type of rennet (Macedo and
397 Malcata, 1996).

398 Compounds derived from protein degradation contribute to cheese flavour
399 and to the development of the correct texture.

400 With respect to the biogenic amine content of the cheese (Table 1), no
401 influence was found of the rennet used for cheese making. The levels of the
402 amines were lower than in other reports of this kind of products (Contreras,
403 Izquierdo, Allara, García, Torres, & Céspedes, 2007).

404 The results thus show a major development of proteolysis in the cheeses
405 during ripening, resulting in the generation of AN corresponding to greater clotting
406 activity of the rennet without any increase of biogenic amine (BA) production.

407 Table 2 presents the parameters of the sensorial analysis of the cheeses
408 at the end of the ripening period, and their correlation with the characteristics of
409 the rennet. The degradation of β -casein was positively correlated with the
410 compactness of the cheese paste, while degradation of the casein is negatively
411 correlated with the acidic taste. The degradation of β -casein appears to
412 negatively influence the creaminess of the cheese, with the greater the
413 degradation the less the creaminess. Some authors suggest that β -casein might
414 be essential for the hardening of curd (St. Gelais et al., 2005). Likewise, β -casein
415 degradation was negatively correlated with the bitter taste of the cheese, ie, the
416 less the degradation, the more bitter the taste.

417 The κ -casein degradation was negatively correlated with the aftertaste of
418 the cheese, with the less the κ -casein degradation, the greater the aftertaste in
419 the cheese.

420 The clotting activity (24 h) influenced the creaminess, viscosity, the type of
421 cheese and its acceptability, with a positive correlation in all cases. Thus, the
422 greater the value of clotting activity, the greater the values of creaminess,
423 viscosity, the “Torta” type of cheese, and the acceptability. Cardoon coagulation
424 leads to significantly softer, yellower, and creamier cheeses (Agboola, Chan,
425 Zhao, & Rehman, 2009).

426 Therefore the most appropriate cardoons for making this cheese are those
427 which show greater clotting activity and moderate proteolytic activity on β -casein
428 mainly, suggesting that the plants of Cluster 1 (Figure 1) provide rennets with
429 desirable characteristics for the cheese. A high ratio of clotting-to- β -casein
430 proteolytic activity is an essential parameter for the classification of the cardoons
431 used in the “Torta del Casar” process.

432 One can conclude that the technological characteristics of this vegetable
433 rennet indeed influence the “Torta del Casar” final product, with the clotting and
434 proteolytic activity being the fundamental parameters that determine these final
435 characteristics. So the use of controlled and characterized cardoons in the
436 manufacturing process of “Torta del Casar” is fundamental to obtaining the
437 homogeneous product demanded by the Registry of the Protected Designation of
438 Origin “Torta del Casar”.

439

440 Acknowledgements

441 The authors are grateful to M. Cabrero and C. Cebrián for technical assistance
442 and PDO “Torta del Casar” for technical support.

443

444 References

445

446 Agboola, S. O., Chan, H. H., Zhao, J., Rehman, A. (2009). *Can the use of*
447 *Australian cardoon (Cynara cardunculus, L.) coagulant overcome the*
448 *quality problems associated with cheese made from ultrafiltered milk?.*
449 LWT – Food Science and Technology, 42, 1352-1359.

450 Benito, M.J., Rodriguez, M., Córdoba, M.G. y Andrade, M.J. (2005). *Effect of the*
451 *fungal protease EPg222 on proteolysis and texture in the dry fermented*
452 *sausage “salchichón”.* Journal of the Science of Food and Agriculture, 85,
453 273-280.

454 Benito, M.J., Martín, A., Aranda, E., Pérez-Navado, F., Ruiz-Moyano, S., y
455 Córdoba, M.G. (2007). *Characterization and selection of autochthonous*
456 *lactic acid bacteria isolated from traditional Iberian dry-fermented*
457 *Salchichón and Chorizo sausages.* Journal of Food Science, 72, 193-201.

458 Caron, A., St-Gelais, D., & Pouliot, Y. (1997). *Coagulation of milk enriched with*
459 *ultrafiltrated or diafiltered milk retentate powders.* International Dairy
460 Journal, 7 (6-7), 445-451.

461 Contreras, M., Izquierdo, P., Allara, M., García, A., Torres, G., Céspedes, E.
462 (2007). *Biogenic Amines Determination in Ripened Cheeses.* Revista
463 Científica, FCV-LUZ, Vol. XVII, 1, 89-95.

464 Creamer, L. K., y Olson, N. F. (1982). *Rheological evaluation of maturing*
465 *Cheddar cheese.* Journal of Food Science, 47, 631-636.

466 Dulley, J. R. (1974). *The contribution of rennet and starter enzymes to proteolysis*
467 *in cheese.* Australian Journal of Dairy Technology, (June), 65-69.

- 468 Enne, G., Elez, D., Fondrini, F., Bonizzi, I., Feligini, M., Aleandri, R. (2005). *High-*
469 *performance liquid chromatography of governing liquid to detect illegal*
470 *bovine milk's addition in water buffalo Mozzarella: Comparison with results*
471 *from raw milk from raw milk and cheese matrix.* Journal of
472 Chromatography A, 1094, 169-174.
- 473 Fernández-Salguero, J., and Sanjuán, E. (1999). *Influence of vegetable and*
474 *animal rennet on proteolysis during ripening in ewe's milk cheese.* Food
475 Chem. 64, 177-183.
- 476 Fox, P. F. (1993). Cheese: An overview. In: P. F. Fox, Cheese: Chemistry,
477 Physics and Microbiology, Vol. 1 (pp. 1-36). London: Chapman & Hall.
- 478 Fox, P. F., y McSweeney, P. L. H. (1996). *Proteolysis in cheese during ripening.*
479 Food Reviews International, 12, 457-509.
- 480 Galán, E., Prados, F., Pino, A., Tejeda, L., Fernández-Salguero, J. (2008).
481 *Influence of different amounts of vegetable coagulant from cardoon Cynara*
482 *cardunculus and calf rennet on the proteolysis and sensory characteristics*
483 *of cheese made with sheep milk.* International Dairy Journal, 18, 93-98.
- 484 Galán, E., Cabezas, L., Fernández-Salguero, J. (2012). *Proteolysis, microbiology*
485 *and sensory properties of ewe's milk cheese produced with plant*
486 *coagulant from cardoon Cynara cardunculus, calf rennet or a mixture*
487 *thereof.* International Dairy Journal, doi:10.1016/j.idairyj.2012.02.001.
- 488 Krížek, M. y Pelikanova, T. (1998). *Determination of seven biogenic amines in*
489 *foods by micellar electrokinetic capillary chromatography.* Journal of
490 Chromatography A, 815, 243-50.

- 491 Laemmli, U.K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the*
492 *head of bacteriophage T4*. *Nature*, 227, 680-685.
- 493 Lawrence, R. C., Creamer, L. K., y Gilles, J. (1987). *Texture development during*
494 *cheese ripening*. *Journal of Dairy Science*, 70, 1748-1760.
- 495 Macedo, I. Q., Faro, C. J., y Pires, E. V. (1993). *Specificity and kinetics of the*
496 *milk-clotting enzyme from Cardoon (Cynara cardunculus, L) toward bovine*
497 *k-casein*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1537-1540.
- 498 Macedo, A. C., y Malcata, F. X. (1996). *Changes in the major free fatty acids in*
499 *Serra cheese throughout ripening*. *International Dairy Journal*, 6, 1087-
500 1097.
- 501 Martín, A., Colín, B., Aranda, E., Benito, M.J. y Córdoba, M.G. (2007).
502 *Characterizacion of Micrococaceae isolated from Iberian dry-cured*
503 *sausages*. *Meat Science*, 75, 696-708.
- 504 Mas Mayoral, M., González Crespo, J. y Nieto Villaseca, M.J. (1991). *Casar*
505 *cheese: production, physicochemical and microbiological characteristics*.
506 *Arch. Zootec.* 40, 359-369.
- 507 Núñez, M., Fernández del Pozo, B., Rodríguez Martín, M. A., Gaya, P., y Medina,
508 M. (1991). *Effect of vegetable and animal rennet on chemical,*
509 *microbiological, rheological and sensory characteristics of La Serena*
510 *cheese*. *Journal of Dairy Research*, 58, 511-519.
- 511 Ordiales, E., Martín, A., Benito, M. J., Hernández, A., Ruíz-Moyano, S., &
512 Córdoba, M. G. (2012). *Technological characterisation by free zone*
513 *capillary electrophoresis (FZCE) of the vegetable rennet (Cynara*

514 *cardunculus*) used in “Torta del Casar” cheese-making. *Food Chemistry*,
515 133, 227-235.

516 Regulation (CE) 1491/2003 of European Commission of 25 of August:
517 Registration of the Protected Designation of Origin “Torta del Casar” in the
518 Register of Protected Designations of Origin and the Protected Geographic
519 Indications.

520 Roa, I., López, M.B., Mendiola, F.J. (1999). *Residual clotting activity and ripening*
521 *properties of vegetable rennet from Cynara cardunculus in La Serena*
522 *cheese*. *Food Research International*, 32, 413-419.

523 Roseiro, L.B.; Barbosa, M.; Ames, J.M.; Wilbey, R.A. (2003). *Cheesemaking with*
524 *vegetable coagulants-the use of Cynara L. for the production of ovine milk*
525 *cheeses*. *International Journal of Dairy Technology*, Vol. 56, Nº 2, 76-85.

526 Sanjuán, E., Millán, R., Saavedra, P., Carmona, M.A., Gómez, R., Fernández-
527 Salguero, J. (2002). *Influence of animal and vegetable rennet on the*
528 *physicochemical characteristics of Los Pedroches cheese during ripening*.
529 *Food Chemistry*, 78, 281-289.

530 Sousa, M. J. C. F. (1993). *Plant Rennet Substitute from Flowers of Cynara*
531 *cardunculus*. M. Sc. Thesis, National University of Ireland Cork.

532 Sousa, M. J. y Malcata, F. X. (1998). *Proteolysis of ovine and caprine caseins in*
533 *solution by enzymatic extracts of Cynara cardunculus cheese*. *Enzyme*
534 *Microbiology and Technology*, 22, 305-314.

535 Sousa, M.J., Ardö, Y. y McSweeney, P.L.H. (2001). *Advances in the study of*
536 *proteolysis during cheese ripening*. *International Dairy Journal* 11, 327-
537 345.

538 St-Gelais, D. y Haché, S. (2005). *Effect on β -casein concentration in cheese milk*
539 *on rennet coagulation properties, cheese composition and cheese*
540 *ripening*. Food Research International, 38, 523-531.

541 Tavaría F.K., Sousa, M.J., and Malcata, F.X. (2001). *Storage and lyophilization*
542 *effects of extracts of *Cynara cardunculus* on the degradation of ovine and*
543 *caprine caseins*. Food chemistry, 72, 79 – 88.

544 Valdés, B., Talavera, S. y Fernández-Galiano, E. (1987). In: Flora Vasculare de
545 Andalucía Occidental. Ketres Editora, S.A. Barcelona. Spain.

546 Van Hekken, D. L., y Holsinger, V. H. (2000). *Use of cold microfiltration to*
547 *produce unique β -casein enriched milk gels*. Lait, 80, 69-76.

548 Veloso, A.C.A., Teixeira, N., Peres, A.M., Mendoça, A., Ferreira, I.M.P.L.V.O.
549 (2004). *Evaluation of cheese authenticity and proteolysis by HPLC and*
550 *urea-polyacrilamide gel electrophoresis*. Food Chemistry, 87, 289-295.

551 Verissimo, P., Esteves, C., Faro, C. y Pires, E. (1995). *The vegetable rennet of*
552 **Cynara cardunculus* L. contains two proteinases with chimosin and pepsin-*
553 *like specificities*. Biotechnology Letters, 17, 621 – 626.

554 Verissimo, P., Faro, C., Moir, A.J., Lin, Y., Tang, J., y Pires, E. (1996).
555 *Purification, characterization, and partial amino acid sequencing of two*
556 *new aspartic proteinases from fresh flowers of *Cynara cardunuculus*, L.*
557 *European Journal Biochemistry*. 235, 762 – 768.

558

559

560 Figure 1. Dendrogram obtained from the proteolytic and clotting activities of
561 cardoon plants with different similarity percentages.

562 Figure 2. Principal component analysis of the proteolysis parameters in cheeses
563 at 2 days of ripening, and technological properties of vegetable rennets: plane 1–
564 2 of variable plot (A); Distribution of cheese batches depending on their
565 classification group on the dendrogram obtained from the proteolytic and clotting
566 activities of cardoon plants according to plane 1–2 of a factorial correspondence
567 analysis (B).

568 Figure 3. Evolution of different parameters during processing.

569 Figure 4. Evolution of proteins during processing. (A) Urea-Page with casein
570 protein extracts from cheeses at 2, 30, and 60 days of ripening. M, standard
571 proteins α , β , and κ caseins. (B) SDS-Page with whey protein extracts from
572 cheeses at 2, 30, and 60 days of ripening. M, molecular weight marker.

573

Table 1. Protein changes of cheeses made with different rennets and the correlations of these characteristics with the clotting and proteolytic activity of the rennet.

	Descriptive statistics					Correlations				
	N	Mean	SD	Min	Max	Clotting activity (R.U.) after maceration		Degradation of caseins		
						24h	1h	α -caseins	β -casein	κ -casein
% Protein	16	16.72	1.13	15.29	19.32	0.235	0.696**	-0.183	0.002	-0.178
Whey protein (mg/g)										
2 days	16	171.8 ^a	42.4	112.1	302.6	-0.082	-0.318	0.025	-0.032	0.137
30 days	16	261.3 ^b	53.7	165.2	344.7	0.12	-0.33	-0.216	-0.282	-0.055
60 days	16	262.4 ^b	34.1	203.4	320.0	0.046	-0.148	0.089	0.028	0.025
Caseins (mg/g)										
2 days	16	285.8 ^c	39.2	222.7	373.7	-0.467	-0.101	0.085	0.243	0.279
30 days	16	244.5 ^b	31.7	178.6	311.6	-0.596*	-0.046	0.117	0.379	0.232
60 days	16	226.5 ^a	26.0	188.4	283.1	-0.556*	-0.17	0.242	0.369	0.43
NPN (mg/g)										
2 days	16	2.05 ^a	0.47	1.36	2.82	-0.039	-0.361	0.206	0.098	0.39
30 days	16	2.81 ^b	0.46	2.03	3.68	0.409	0.031	-0.021	0.055	0.127
60 days	16	3.54 ^c	0.90	2.20	6.02	-0.026	-0.354	-0.302	-0.166	-0.275
AN (mg/g)										
2 days	16	0.60 ^a	0.10	0.45	0.78	0.013	-0.37	-0.198	-0.119	-0.486+
30 days	16	1.19 ^b	0.24	0.70	1.63	0.500*	-0.116	-0.344	-0.278	-0.293
60 days	16	1.63 ^c	0.40	1.16	2.49	0.568*	0.094	0.056	-0.105	-0.193
BA (mg/g 60 days)										
Putrescine	16	0.069 ^a	0.084	nd	0.408	0.098	-0.194	-0.269	-0.349	-0.096
Cadaverine	16	0.148 ^a	0.494	nd	0.493	0.13	-0.052	-0.768**	-0.539*	-0.473
Tryptamine	16	0.006 ^a	0.018	nd	0.066	0.078	-0.094	-0.123	-0.030	-0.078
Spermidine	16	0.012 ^a	0.018	nd	0.103	-0.308	-0.363	0.128	0.164	-0.028

Spermine	16	0.224 ^a	0.404	nd	0.446	0.384	-0.219	0.283	0.037	0.097
Tiramine	10	0.036 ^a	0.097	nd	0.575	0.127	-0.212	-0.374	-0.096	-0.523

^a Means of the same parameter in the same column without a common superscript letters (a-c) differ significantly (P<0.05)

+ P<0.1.

* P<0.05.

** P<0.01.

nd: not detected

Table 2. Descriptive statistics of the sensorial attributes of the batches studied. and correlations with technological properties of the vegetable rennets used.

Sensorial attributes	Descriptive statistics					Correlation				
						Clotting activity (R.U.) after maceration		Degradation of caseins		
	N	Mean	SD	Min	Max	24h	1h	α -caseins	β -casein	κ -casein
Compact paste	16	5.61	0.65	4.10	6.60	0.009	-0.082	0.418	0.534*	0.182
Acid odour	16	3.88	0.61	2.72	5.06	-0.043	-0.399	-0.454	-0.576*	-0.432
Hardness	16	4.18	0.66	2.95	4.99	-0.317	-0.087	0.31	0.494	0.187
Creaminess	16	4.79	0.77	3.50	6.01	0.507*	0.028	-0.337	-0.532*	-0.227
Viscosity	16	4.01	0.94	2.66	5.45	0.657**	-0.064	-0.209	-0.367	-0.273
Salty	16	4.68	0.47	3.68	5.70	-0.402	-0.345	-0.092	-0.058	-0.206
Bitter	16	3.21	0.47	2.47	3.94	0.13	-0.344	-0.298	-0.519*	-0.138
Pungent	16	1.43	0.36	0.92	2.02	-0.246	-0.076	-0.139	-0.062	-0.275
Acid	16	3.89	0.58	2.89	4.86	-0.146	-0.403	-0.222	-0.364	-0.334
Astringent	16	1.78	0.37	1.10	2.55	-0.16	-0.058	-0.376	-0.383	-0.37
Rancid	16	0.72	0.17	0.48	1.07	-0.195	-0.055	-0.017	-0.188	0.103
Aroma intensity	16	6.11	0.46	5.22	6.85	-0.062	-0.043	-0.381	-0.351	-0.453
Aftertaste	16	5.83	0.40	5.34	6.60	0.053	0.002	-0.482	-0.430	-0.550*
Kind of cheese "Torta"	16	4.24	0.81	2.80	5.39	0.515*	-0.198	-0.247	-0.354	-0.272
Acceptability	16	6.01	0.56	5.18	6.88	0.504*	0.176	-0.127	-0.127	-0.016

* P<0.05.

** p<0.01.

Figure 1

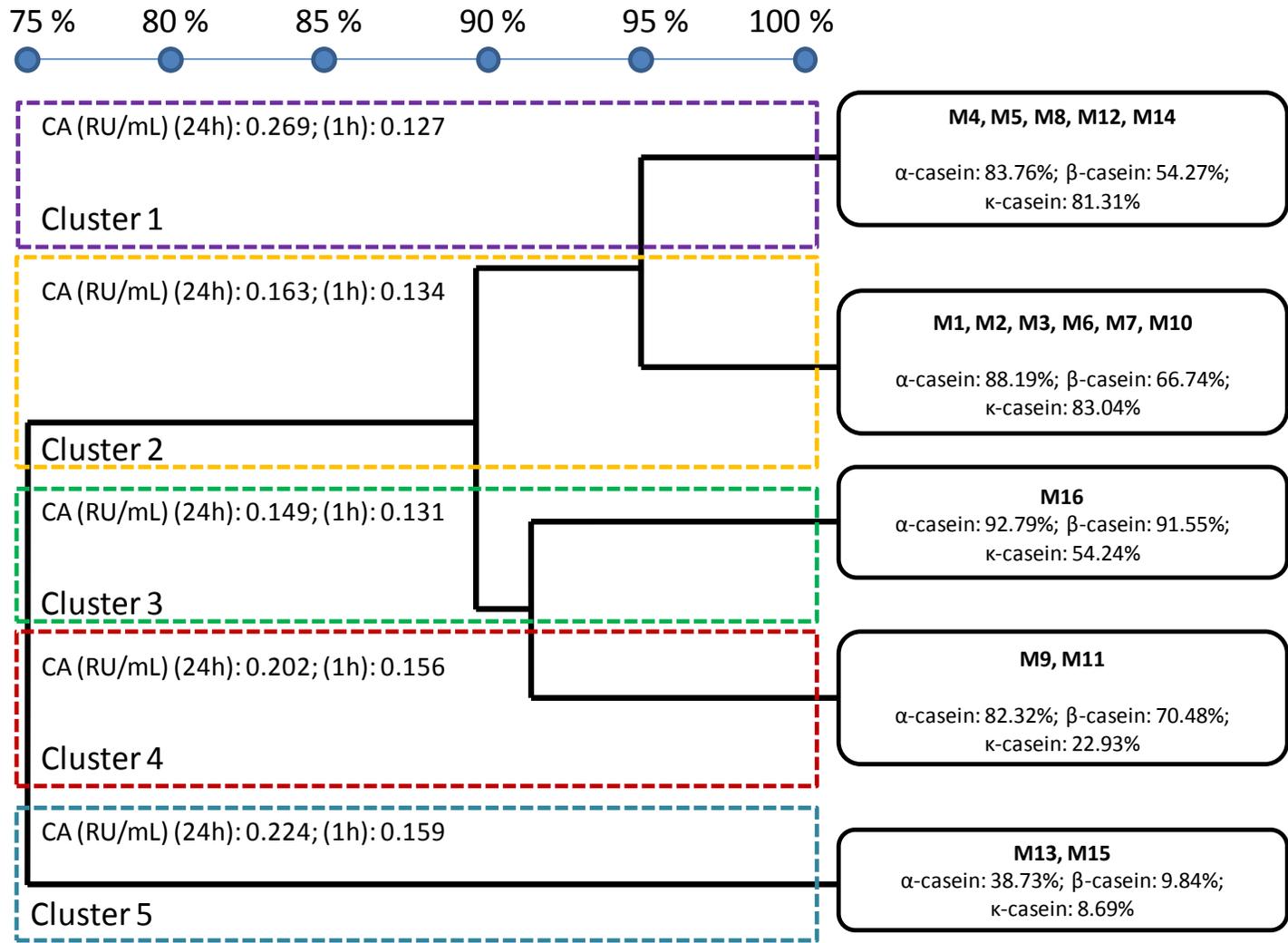


Figure 2

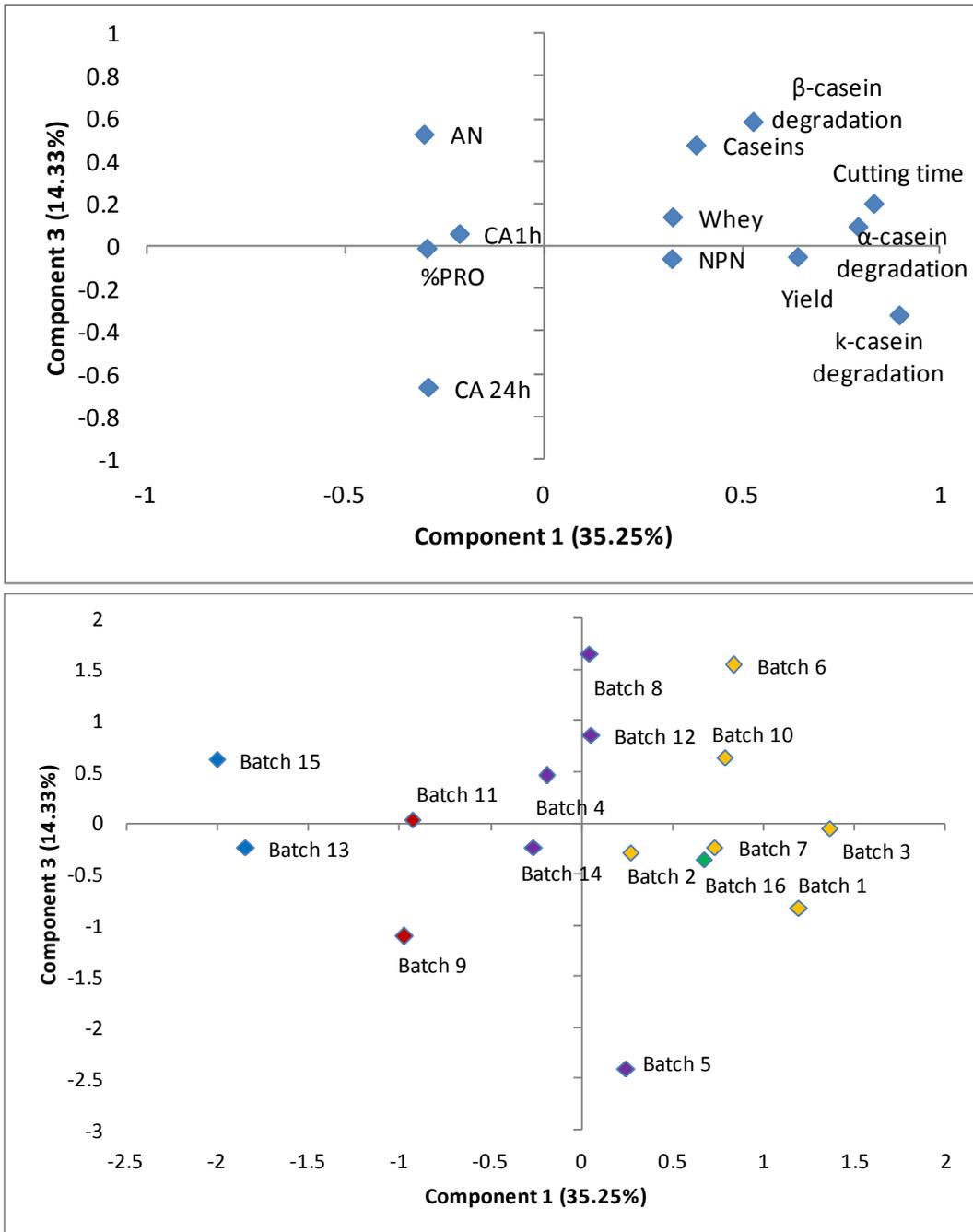


Figure3

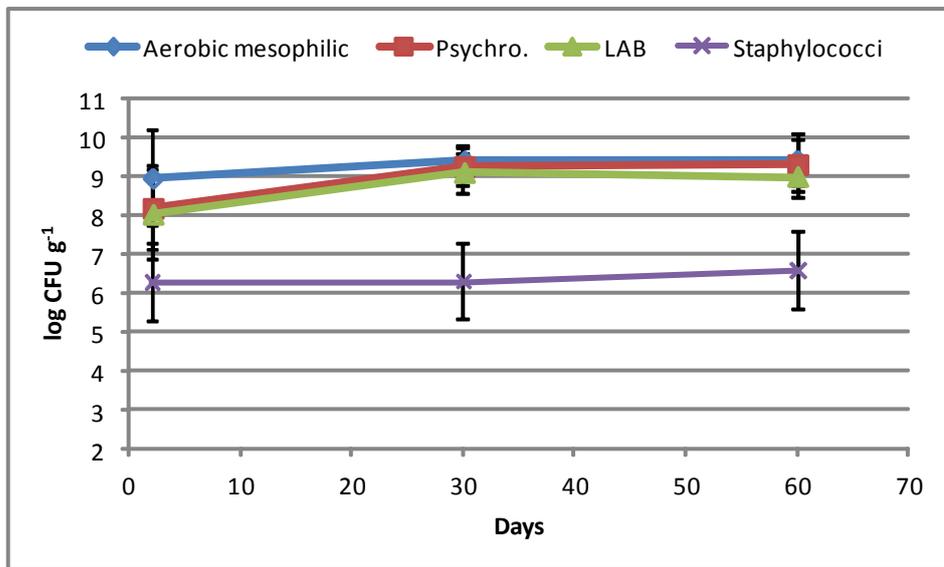
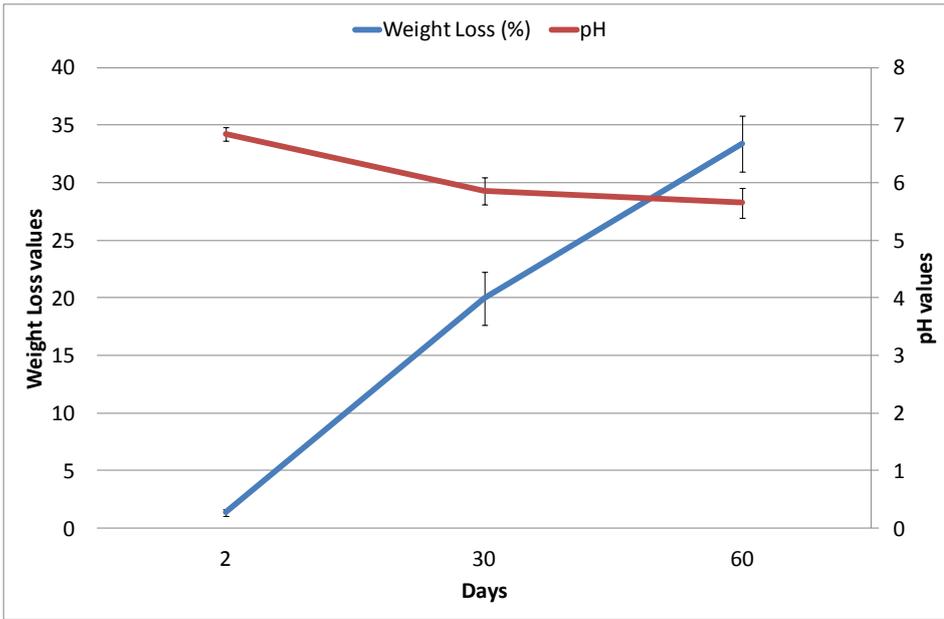
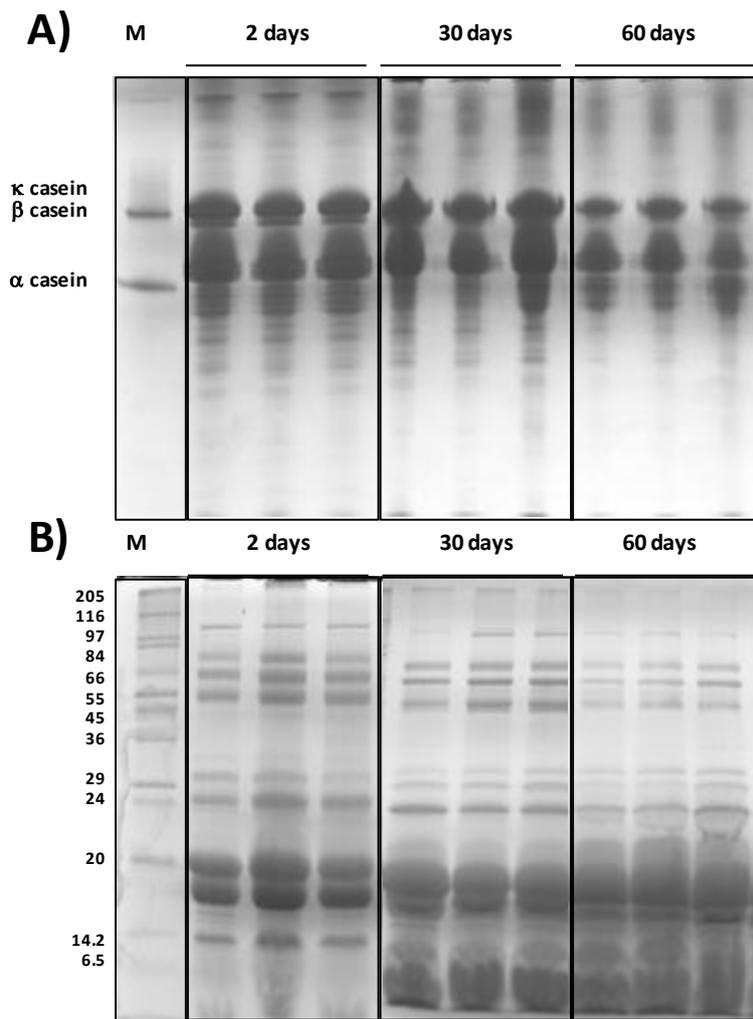


Figure 4



IV.3.3. Role of autochthonous microorganisms on the texture characteristics of the traditional cheese “Torta del Casar”.

1 **Role of autochthonous microorganisms on the texture characteristics of the traditional**
2 **cheese “Torta del Casar”.**

3

4 Elena Ordiales^a; María José Benito^{b*}; Alberto Martín^b, Margarita Fernández^b; Rocío Casquete^b;
5 María de Guía Córdoba^b

6

7 ^a Agricultura, Centro Tecnológico Agroalimentario Extremadura (CTAEX), Ctra. Villafranco a
8 Balboa Km. 1.2, Villafranco del Gadiana, 06195 Badajoz, Spain

9 ^b Nutrición y Bromatología, Escuela de Ingenierías Agrarias, Universidad de Extremadura, Ctra.
10 de Cáceres s/n, 06071 Badajoz, Spain

11

12

13

14 *Corresponding author

15 Tel.: +34 924 286200; fax: +34 924 286201

16 E-mail address: mjbenito@unex.es

17 <http://eia.unex.es>

18

19 **Abstract**

20 The aim of the present work was to investigate the effect of the autochthonous microorganism on
21 the development of texture and sensory characteristics in the traditional cheeses “Torta del
22 Casar”. In addition, determine the microorganisms that play an important role in the development
23 of the texture characteristic of these cheeses. The counts in the raw materials show that the lactic
24 acid bacteria population in cheese comes mainly from milk, while psychrotrophs and enterococci
25 population comes from the rennets. The counts in cheese during the ripening process showed that
26 the diferentes populations increased from the beginning to 30 days of ripening, and remain
27 constant or decreased slightly at the end of ripening.

28 The microbial effect in the primary proteolysis was low and only the enterococci group was
29 positively correlated with AN and IGA at 30 days of ripening, and NPN and IP at 60 days. About
30 the texture parameters, it was observed how the psychrotrophos, lactic acid bacteria, lactococci
31 and enterococci were positively correlated with adhesiveness parameters; and enterobacteria and
32 coliforms were negatively correlated. In the sensory analysis, psychrotrophos, lactic acid bacteria,
33 lactococci, and staphylococci were positively correlated with the creaminess and viscosity data
34 were. In conclusion, microorganisms have shown a decisive influence on the studied parameters
35 related to proteolysis and texture along the ripening process, emphasizing the role of lactic acid
36 bacteria, lactococci and enterococci. Thus, to control the process, it would be advisable the control
37 of these microorganisms development, being essential the development of an autochthonous
38 starter culture suitable for this traditional product.

39

40 **Keywords:** Torta del Casar, autochthonous microorganisms, proteolysis, texture.

41

42 1. Introduction

43 “Torta del Casar” is a high quality Spanish cheese marketed under the Registry of the
44 Protected Designation of Origin “Torta del Casar” (Casar de Cáceres, Cáceres, Spain) in
45 accordance with the Regulations (CE) 1491/2003 of the European Commission. This type of
46 cheese is made from raw sheep’s milk only with the dried flowers of the plant *Cynara*
47 *cardunculus* as rennet and without any deliberate addition of a starter. This cheese is much
48 appreciated by consumers for its high quality and unique flavour. The use of Merino ewe’s raw
49 milk and plant coagulant provides characteristic slightly bitter taste and a spreadable texture
50 (Delgado et al., 2010). Texture is an important characteristic of cheese in deciding consumer
51 acceptability. Proteolysis contributes to cheese matrix textural changes due to the protein network
52 breakdown. Physicochemical changes exert, in turn, a major influence upon the rheological and
53 sensory properties of the final cheese as perceived by consumers, which determine their
54 preference and eventual acceptability; appearance and texture are indeed the primary features at
55 stake during cheese purchase (Pereira et al., 2009).

56 Several microorganisms, including bacteria, yeasts and moulds, are present in cheese
57 throughout ripening. Hence, they contribute to maturation, either directly via their metabolic
58 activity, or indirectly via release of enzymes into the cheese matrix, after autolysis. These
59 microorganisms come from the raw materials used in the cheese manufacture, the rennet and the
60 raw milk. Although most of the microflora of raw milk comprises lactic acid bacteria (LAB), e.g.
61 *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp., other microorganisms as coliforms, *Staphylococcus* spp.,
62 *Enterococcus*, *Pseudomonas*, etc. are also very frequently and have to be controlled because of
63 the potential public health hazards of some of this kind of microorganism (Almeida et al., 2007).
64 Rennet also plays an important role in the onset and development of much of the microorganism
65 that appears in the cheeses, and in this case, there are no studies developed regarding the
66 identification and characterization thereof. The activities of these contaminating microorganisms
67 affect the characteristics of the final cheese. In particular, the action of LAB via initial
68 fermentation of lactose and breakdown of proteins, or via more complex catabolic reactions later

69 during ripening, is a well-known contributor to the organoleptic features perceived in the final
70 cheese (Menéndez et al., 2000). Degradation of proteins, carbohydrates and fat is also due to the
71 microorganism activities which directly influence the taste and texture of the cheese.

72 Proteolysis in cheese during ripening plays a vital role in the development of texture as
73 well as flavour (Fox and McSweeney, 1996). Proteolysis contributes to textural changes of the
74 cheese matrix, due to breakdown of the protein network, decrease in a_w through water binding by
75 liberated carboxyl and amino groups and increase in pH (Sousa et al., 2001).

76 Primary proteolysis releases large to medium-sized peptides from caseins; these can be
77 further degraded into small peptides and eventually FFA, as part of a process known as secondary
78 proteolysis. The former plays an essential role in the development of proper cheese texture,
79 whereas secondary proteolysis is more directly implicated with cheese flavour; hence, both are of
80 great importance to assure a well-balanced breakdown of curd proteins (caseins) (Visser, 1993).
81 The main proteolytic agents in the ripening process are the rennet or clotting enzymes retained in
82 the curd, and the proteases and peptidases from microorganisms (Fox and Law, 1991).

83

84 The aim of the present work was to investigate the effect of the autochthonous microorganism on
85 the development of texture and sensory characteristics in the traditional cheeses “Torta del
86 Casar”. In addition, determine the microorganisms that play an important role in the development
87 of the texture characteristic of these cheeses.

88

89 **2. Materials and Methods**

90 *2.1. “Torta del Casar” cheese-making procedure*

91 A total of sixteen different batches of “Torta del Casar” were manufactured, of 10 cheeses each
92 batch, from unpasteurized Merino ewe’s milk to which no starter cultured was added. Each batch

93 was clotted using different *C. cardunculus* L. rennets, corresponding to the 16 plants collected as
94 Ordiales et al. (2012). The aqueous extracts from the cardoon *C. cardunculus* L. were prepared
95 from 50 g of dried flowers in 1 L of water, leaving them to macerate for 24 h, and adding 10 mL
96 of this extract per litre of milk at 28–30° C, for each 32 L batch. After pressing, the cheeses were
97 immersed in a salt solution (16 % (w/v) NaCl) for 4 hours. The ripening took place at a
98 temperature of 5–10° C and relative humidity of 85–90 % throughout the ripening period of 60
99 days. Three cheeses of each batch were randomly taken for analysis after 2, 30 and 60 days of
100 ripening.

101 2.2. Microbiological analysis

102 Microbiological analysis was performed to raw milk, rennets and cheeses made from those raw
103 materials.

104 For the microbial counts and isolates, 10 g aliquots of each sample were taken aseptically,
105 transferred to sterile plastic pouches, 10-fold diluted with 1% peptone water (Pronadisa,
106 Alcobendas, Madrid, Spain), and homogenized for 120 s using the laboratory Stomacher Lab-
107 Blender 400 (Seward Lab., London, England). Serial 10-fold dilutions were prepared from the
108 same solution and inoculated onto agar plates.

109 Plate count agar (PCA, Oxoid) were used for mesophilic aerobic bacteria counts at 30°C for 48 h
110 and for psychrotrophs for 7 days at 7°C. Lactic acid bacteria (LAB) were grown in MRS agar
111 (Oxoid) of which the pH was adjusted to 5.6 with acetic acid (10%), incubating at 37°C for 2 days
112 under anaerobic conditions and lactococci on M-17 agar (M-17, Oxoid) at 30 °C for 48 h. The
113 *Staphylococcus* and *Micrococcus* counts were determined in MSA agar (Oxoid) at 30°C for 48 h,
114 and for *Staphylococcus* Baird Parker agar (BP; Oxoid) was also used supplemented with
115 potassium tellurite and egg yolk emulsion at 37°C for 48 h, and black colonies were counted.
116 Total enterobacteria (Gram-negative and cytochrome oxidase-negative) were inoculated on Violet
117 Red Bile Glucose agar (VRBG; Oxoid), the plates were covered with a layer of the same medium
118 before incubation at 37°C for 24 hours, and colonies that were rose-coloured and surrounded by a

119 halo of purple precipitate were counted. Violet Red Bile Agar (VRBA) was used for coliform
120 counts and the inoculated plates of this medium were also covered with a layer of the same
121 medium before incubation at 30°C for 48 h. Typical dark red colonies (>0.5 mm in diameter)
122 surrounded by a zone of precipitated bile acids were considered as coliforms for the counts.
123 Moulds and yeasts were isolated on acidified Potato Dextrose Agar (PDA; Oxoid) with 5%
124 sulfuric acid and incubated at 26°C for 96 h.

125 *2.3. Moisture, water activity, and pH determination*

126 The moisture content of the cheeses was determined by dehydration at 100°C to constant weight
127 by the ISO recommended methods (ISO, 1973). Water activity (A_w) was determined using an
128 FA-St/1 apparatus from GBX (France Scientific Instrument). The pH was measured using a
129 Crison mod. 2002 pH meter (Crison Instruments, Barcelona, Spain).

130 *2.4. Parameters related to protein fraction*

131 *Whey and caseins protein analysis:* The whey protein fractions were extracted from cheese as
132 (Enne et al., 2005). Samples (20 g) were homogenized (2 cycles of 1 min each) in doubly distilled
133 water (30 ml) with an Ultraturrax homogenizer (Ika®-Werke, Staufen, Germany). Since this step
134 is heat-producing, a strict time optimization was required to avoid whey proteins' degradation.
135 The homogenized samples were skimmed by centrifugation ($2000 \times g$ for 15 min at 4 °C). Casein
136 was precipitated at its isoelectric point by adding 1M hydrochloric acid and centrifuging at $2500 \times$
137 g for 10 min at 4 °C.

138 Caseins were obtained from 1g of cheese samples by precipitation at pH 4.3, by the addition of 10
139 ml of 1 M ammonia–acetate buffer at 8°C during 20 min (Velooso et al., 2004). Then the samples
140 were centrifuged for 15 min at 3000 g at 4°C, to recover the precipitated caseins. The caseins were
141 dispersed in 10 ml of 1 mM ammonia–acetate buffer (pH 4.3), precipitated again and centrifuged
142 for 10 min, at 3000 g, at 4°C. This procedure was repeated twice. In order to eliminate the
143 remaining fat, the sample was washed with 5 ml acetone and left to dry at room temperature.

144 Finally, the dried powdered casein was stored at -80 °C until analysis. The protein concentration
145 was determined following the Bradford method using 100 µl of the soluble protein extracts.

146 *Non-protein nitrogen and amino acid nitrogen analysis:* Non-protein nitrogen (NPN) was
147 determined by the Nessler method using 4 g of sample after protein precipitation with 0.6 M
148 perchloric acid. Amino acid nitrogen (AN) was determined from the 0.6 M perchloric acid protein
149 precipitation fraction after peptide precipitation with 10% sulfosalicylic acid (Benito et al., 2005).
150 Two index have been used to analyze the proteolysis degree found in cheeses, IP (% proteolysis
151 rate) as the relation between NPN and TN, and IGA (% amino acids generation rate), which
152 relates AN to NPN.

153 *2.5. Texture analysis*

154 Two different instrumental texture analyses were performed using a TA.XTA2i texture analyzer
155 (Stable Micro Systems, Godalming, UK).

156 Texture compression analysis (TCA) of the samples was performed at room temperature, using a
157 cylindrical probe of 4 mm diameter. The procedure involved cutting slices approximately 1.5 cm
158 thick. Force–time curves were recorded at a cross-head speed of 1 mm s⁻¹ 164 and 10 mm
159 distance. Hardness (g), defined as maximum peak force during a compression cycle, cohesiveness
160 (g s), area under the positive curve, adhesiveness (g), maximum negative peak, and F-T 2:3 area
161 (g s), area under the negative curve, were evaluated at 2, 30, and 60 days of the process.

162 A texture spreadability analysis (TSA) was also performed at 60 days of ripening using a TTC
163 Spreadability Fixture probe. The samples were packed into the lower cone with a spatula. The
164 curves were produced at a test speed of 3 mm s⁻¹ 170 and 25 mm distance. Firmness (g) and
165 work of shear (g s) will be the maximum peak and the area under the first curve. The maximum
166 negative peak indicates the stickiness (g) of the sample, and the maximum negative area is taken
167 as the work of adhesion (g s).

168

169 *2.6. Sensory evaluation*

170 Fifteen panelists, previously selected and trained under ISO standards with samples of “Torta del
171 Casar” cheese, were asked to characterize the sensory quality of the batches selected according to
172 the protein profile of the cardoon used for the clotting stage. The cheeses were cut into slices of
173 approximately 5 mm thickness. The slices were equilibrated for 30 min at room temperature
174 before serving. Descriptive analyses were made according to international standard methods.
175 Parameters related to appearance and texture were assessed using a structured line scale with
176 intensity descriptors at the end points (1, low; 10, high). The samples were three-digit coded and
177 the order of serving was determined by random permutation. Two replicate panels performed for
178 each sample. The response to each indicator was taken as the mean of the panelists’ responses. In
179 addition to this descriptive test, a panel of 17 untrained consumers evaluated the samples for
180 overall acceptability in base of kind of cheese.

181

182 *2.7. Statistical analysis*

183 Statistical analysis of the data was carried out using SPSS for Windows, 15.0. (SPSS Inc.
184 Chicago, Illinois, USA). Descriptive statistics of the vegetable rennet activities were determined,
185 and the evolution of the physicochemical, microbial, and texture parameters of the cheese batches
186 were studied by one-way analysis of variance (ANOVA), and separated by Tukey’s honest
187 significant differences test ($p \leq 0.05$). The relationships between the microorganism counts and
188 protein, texture and sensorial parameters analyzed on the cheeses were evaluated in terms of
189 Pearson correlation coefficients.

190

191 **3. Results and Discussion**

192 *Microbial counts in raw materials*

193 The counts in the raw materials are shown in Table 1. It can be observed that highest counts of
194 enterobacteria and coliforms were found in the rennets, while milk would provide higher amount
195 of lactic acid bacteria, lactococci, enterococci, staphylococci, micrococci and molds to the cheese.
196 The correlations of the cheese counts at 2 day of ripening with the counts from rennets and milk,
197 raw materials used in the processing of cheese batches, are shown in Table 2. The results show
198 that the lactic acid bacteria population in cheese after 2 days of ripening comes mainly from milk,
199 while psychrotrophs and enterococci population comes from the rennets. This indicates that it
200 would be important to monitor and identify the microorganisms that provide the raw materials and
201 more specifically the rennets, which have never been studied, as they may have great significance
202 in the final product as well as health consumer. On the other hand, the microbiological
203 contamination of the milk is expected to exert an influence upon the final characteristics of the
204 cheese (Pintado et al., 2010). The raw milk microbiota is an essential component of many
205 traditional cheese varieties and plays important roles during both cheese manufacture and ripening
206 (Beresford et al., 2001). Thus, Lactic acid bacteria (LAB) and other indigenous microflora seem
207 to occupy a central role in cheese – making and the generation of the distinctive flavor of cheeses
208 (Buchin et al., 1998; Leroy and DeVuyst, 2004; Abriouel et al., 2008).

209

210 *Microbial counts in cheese during processing*

211 Table 3 shows the counts in cheese during the ripening process. The coliforms and enterobacteria
212 populations increased slightly from the beginning to 30 days of ripening, and decreased modestly
213 at the end of ripening. The aerobic mesophilic bacteria slightly increased while the psychrotrophs
214 remained around 9.2 log CFU/g throughout ripening process. Lactobacilli increased between the
215 beginning and middle, to remain constant until 60 days of ripening while lactococci decreased
216 slightly at the end of ripening. The population of enterococci increased at the beginning of the
217 process and staphylococci and micrococci remained constant throughout the cheese ripening.
218 Finally molds and yeasts decreased moderately from the beginning to the end of cheese ripening.

219 Some authors have obtained similar results in the different microbial groups that develop in the
220 cheese (Tavaira et al., 1998; Galán et al., 2012).

221 Within the LAB group *Enterococcus* is the most controversial genus, because their natural
222 habitat is the mammalian intestinal tract and their presence in foodstuffs has usually been related
223 to poor standards of hygiene during manufacture (López – Díaz et al., 1995). However, in recent
224 years, some studies into microbiota of many traditional cheeses in Mediterranean countries have
225 indicated that they may well play an important role in the ripening of these cheeses, probably
226 through proteolysis, and lipolysis, hence contributing to their typical sensory characteristics
227 (Foulquié Moreno et al., 2006).

228

229 *Moisture, water activity, and pH changes*

230 The pH of the cheeses decreased along maturation, moderately at the beginning from 6.85
231 to 5.86, reaching pH values of 5.65 at 60 days of ripening (Figure 1A). The moisture of the
232 cheeses decreased progressively during ripening, from 56.6% to 40.8% at 60 days. The same
233 evolution was observed for the water activity of cheeses, decreasing from 0.97 to 0.95 (30 days)
234 and 0.94 at the end of the process. The results were similar to those obtained for other soft cheeses
235 (Roa et al., 1999; Sanjuán et al., 2002). The pH is of great importance in cheese ripening due to its
236 influence on the proteolytic activity. These pH changes may reflect the major metabolic activity
237 of lactic acid bacteria in this type of ewe's milk cheese.

238

239 *Changes in the nitrogen fraction during processing*

240 Figure 1B shows the evolution of different parameters related to proteins along the
241 ripening process. Whey proteins increased from 171 to 262 mg/g until 30 days of ripening,
242 remaining constant until the end of ripening. However, the caseins decreased gradually during

243 ripening, from 284 to 226 mg/g, because of proteolysis mediated primarily by rennet, and then
244 by the microorganisms present in the process (Pintado et al., 2010; Pereira et al., 2010). The
245 whey proteins increase was due to casein breakage which generated soluble peptides extracted
246 with whey proteins. Similarly, the amount of NPN in cheese increased during the ripening
247 from 2.05 to 3.55 mg N/g, and the amount of AN, from 0.59 to 1.63 mg N/g. Proteolysis rates,
248 IP and IGA, also showed higher values during the process, proving the proteolysis effect
249 during the whole process. This effect seems to be more intense in the second part of the
250 ripening, indicating the possible influence of microorganisms in this activity. Similar results
251 were obtained for different authors (Núñez et al., 1991; Macedo and Malcata, 1997; Vioque et
252 al., 2000) traditional cheeses coagulated with vegetable rennet.

253 In this way, the different parameters related to proteolysis were correlated with the
254 microbial counts from the different ripening days (Table 4). At the beginning of the process (2
255 days), it was not showed correlation with microbial counts. This indicates that the microbial
256 effect in the primary proteolysis is low, as was indicated above. Proteolysis at this stage would
257 be related to the rennet. However, as ripening progresses the microbial effect on these
258 parameters was more evident. It was showed that the enterococci group was positively
259 correlated with AN and IGA at 30 days of ripening, and NPN and IP at 60 days. This suggests
260 the importance of this microbial group in the proteolysis developed during the process. Other
261 microbial groups that were positively correlated with the proteolysis parameters, were the
262 psychrotroph, lactobacilli, lactococci and staphylococci at the end of processing (60 days).

263 So these are the microbial groups that seem more related to protein degradation in
264 these products. Proteolysis increases the level of free amino acids and peptides which leads to
265 enhanced flavor intensity and accelerates cheese ripening (Corsetti et al., 1998; Franklin et al.,
266 1963; Lane et al., 1996; Lynch et al., 1996; McSweeney et al., 1993).

267 *Texture, and sensory analyses*

268 In the Texture compression analysis (TCA) results of the parameters evolution along
269 the maturation are shown in Figure 2A. Hardness and cohesiveness were gradually decreased
270 during ripening, while the values of adhesiveness and Area F-T 2:3 were higher as it advanced
271 processing. The hardness and cohesiveness decrease of cheeses indicate a higher proteolysis
272 (Awad et al., 2005), and the adhesiveness increase indicates the ability of proteins to interact
273 with water (Pastorino et al., 2003), which take place during ripening.

274 Thus, in the texture spreadability analysis (TSA) at 60 days, the mean values of the
275 parameters of firmness and work of shear were 7100 g and 6750 g s respectively (Figure 2B).
276 The average value of stickiness was 4750 g (absolute value), while the work of adhesion
277 showed a mean of 484 g s (absolute value).

278 These data were correlated with microbial counts obtaining the results showed in
279 Table 5. Again, counts at 2 days did not correlate with almost any texture parameter, indicating
280 the lower effect of the microorganisms at the beginning of the process. The early change in the
281 texture is attributed to a number of factors such as proteolysis of casein network by rennet
282 (Lucey et al., 2003).

283 It can be observed how the microbial groups that are positively correlated with
284 adhesiveness parameters were psychrotrophos, lactic acid bacteria, lactococci and enterococci
285 with the counts found at 2, 30 and 60 days. Instead, enterobacteria and coliforms were
286 negatively correlated, rising to highlight the negative effect of these microbial groups in the
287 texture of the cheeses. This group also correlated negatively with hardness and cohesiveness at
288 60 days, so an increase of these organisms produces a large softening of the product.

289 Similar results were obtained in the sensory analysis (Table 6). In which the microbial
290 groups that were positively correlated with the creaminess and viscosity data were
291 psychrotrophos, lactic acid bacteria, lactococci, and staphylococci. The group of lactic acid
292 bacteria and lactococci with the acidity parameter, and these same groups and enterococci

293 were positively correlated with the intensity. In all these cases the sensory parameters were
294 correlated with the counts found after 2 days of ripening. Finally, as to the overall evaluation
295 by the type of cheese “Torta del Casar” were psychrotrophos, lactic acid bacteria, lactococci,
296 enterococci and staphylococci counts, which were positively correlated with this parameter.

297 In conclusion, microorganisms have shown a decisive influence on the studied
298 parameters related to proteolysis and texture along the ripening process, emphasizing the role
299 of lactic acid bacteria, lactococci and enterococci. Thus, to control the process, it would be
300 advisable the control of these microorganisms development, being essential the development
301 of an autochthonous starter culture suitable for this traditional product.

302 **Acknowledgements**

303 The authors are grateful to M. Cabrero and C. Cebrián for technical assistance, and to PDO “Torta
304 del Casar” for technical support.

305 **References**

- 306 Abriouel, H., Martín-Platero, A., Maqueda, M., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M. 2008.
307 Biodiversity of the microbial community in a Spanish farmhouse cheese as revealed by
308 cultura-dependent and culture-independent methods. *Int. J. Food Microbiol.* 127, 200-208.
- 309 Almeida, G., Figueredo, A., Rôla, M., Barros, R., Gibbs, P., Hogg, T., Teixeira, P. 2007.
310 Microbiological characterization of randomly selected Portuguese raw milk cheeses with
311 reference to food safety. *J. Food Prot.* 70, 1710-1716.
- 312 Awad, S., Hassan, A.N., Muthukumarappan, K. 2005. Application of Exopolysaccharide-
313 Producing cultures in reduced-fat cheddar cheese: texture and melting properties. *J. Dairy*
314 *Sci.* 88, 4204-4213.

- 315 Benito, M.J., Rodríguez, M., Córdoba, M.G., Andrade, M.J. 2005. Effect of the fungal protease
316 EPg222 on proteolysis and texture in the dry fermented sausage “salchichón”. *J. Sci. Food*
317 *Agr.* 85, 273-280.
- 318 Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L., Cogan, T.M. 2001. Recent advantages in
319 cheese microbiology. *Int. Dairy J.* 11, 259-274.
- 320 Corsetti, A., Gobbetti, M., Smacchi, E., De Angelis, M., Rossi, J. 1998. Accelerated ripening of
321 Pecorino Umbro cheese. *J. Dairy Res.* 65, 631-642.
- 322 Delgado, F.J., González-Crespo, J. Cava, R., García-Parra, J., Ramírez, R. 2010. Characterisation
323 by SPME-GC-MS of the volatile profile of a Spanish soft cheese P.D.O. Torta del Casar
324 during ripening. *Food Chem.* 118, 182-189.
- 325 Enne, G., Elez, D., Fondrini, F., Bonizzi, I., Feligini, M., Aleandri, R. 2005. High-performance
326 liquid chromatography of governing liquid to detect illegal bovine milk’s addition in
327 water buffalo Mozzarella: Comparison with results from raw milk from raw milk and
328 cheese matrix. *J. Chromatogr. A* 1094, 169-174.
- 329 Foulquié Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., DeVuyst, L. 2006. The role and
330 application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 1-24.
- 331 Fox, P.F., Law, J. 1991. Enzymology of cheese ripening. *Food Biotechnol.* 5, 239-262.
- 332 Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. 1996. Proteolysis in cheese during ripening. *Food Rev. Int.* 12,
333 457-509.
- 334 Franklin, J.G., Sharpe, M.E. 1963. The incidence of bacteria in cheesemaking and Cheddar cheese
335 and their association with flavor. *J. Dairy Res.* 30, 87-99.
- 336 Galán, E., Cabezas, L., Fernández-Salguero, J. 2012. Proteolysis, microbiology and sensory
337 properties of ewe’s milk cheese produced with plant coagulant from cardoon *Cynara*

338 cardunculus, calf rennet or a mixture thereof. *Int. Dairy J.*
339 doi:10.1016/j.idairyj.2012.02.001.

340 International Organization for Standardization (ISO). UNE-ISO 4121-2006. Sensory Analysis-
341 Guidelines for the Use of Quantitative Response Scales; ISO: Geneva, Switzerland.

342 ISO 1973. ISO in meat and meat product-determination of moisture content method 1442.
343 Geneva. ISO.

344 Lane, C.N., Fox, P.F. 1996. Contribution of starter and added lactobacilli to proteolysis in
345 Cheddar cheese during ripening. *Int. Dairy J.* 6, 715-728.

346 Leroy, F., De Vuyst, L. 2004. Lactic acid bacteria as cultures for the food fermentation. *Trends*
347 *Food Sci. Tech.* 15, 67-78.

348 López-Díaz, T.M., Santos, J.A., González, C.J., Moreno, B., García, M.L. 1995. Bacteriological
349 quality of a traditional Spanish blue cheese. *Milchwiss.* 50, 503-504.

350 Lucey, J.A., Johnson, M.E., Horne, D.S. 2003. Perspectives on the basis of the rheology and
351 texture properties of cheese. *J. Dairy Sci.* 86, 2725-2743.

352 Lynch, C.M., McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cogan, T.M., Drinan, F.B. 1996. Manufacture of
353 cheddar cheese with and without adjunct lactobacilli under controlled microbiological
354 conditions. *Int. Dairy J.* 6, 851-867.

355 Macedo, A.C., Malcata, F.X. 1997. Technological optimization of the manufacture of Serra
356 cheese. *J. Food Eng.* 31, 433-447.

357 McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Lucey, J.A., Jordan, K.N., Cogan, T.M. 1993. Contribution of the
358 indigenous microflora to the maturation of Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 3, 613-634.

359 Menéndez, S., Centeno, J.A., Godínez, R., Rodríguez – Otero, J.L. 2000. Effects of various
360 *Lactobacillus* strains on the ripening and organoleptic characteristics of Arzua-Ulloa
361 cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 59, 37 – 46.

- 362 Núñez, M., Fernández del Pozo, B., Rodríguez Martín, M. A., Gaya, P., Medina, M. 1991. Effect
363 of vegetable and animal rennet on chemical, microbiological, rheological and sensory
364 characteristics of La Serena cheese. *J. Dairy Res.* 58, 511-519.
- 365 Ordiales, E., Martín, A., Benito, M.J., Hernández, A., Ruíz-Moyano, S., Córdoba, M.G. 2012.
366 Technological characterisation by free zone capillary electrophoresis (FZCE) of the
367 vegetable rennet (*Cynara cardunculus*) used in “Torta del Casar” cheese-making. *Food*
368 *Chem.* 133, 227-235.
- 369 Pastorino, A.J., Hansen, C.L., McMahon, D.J. 2003. Effect of salt on structure-function
370 relationships of cheese. *J. Dairy Sci.* 86, 60-69.
- 371 Pereira, C.I., Gomes, A.M.P., Malcata, F.X. 2009. Microstructure of cheese: processing,
372 technological and microbiological considerations. *Trends Food Sci. Tech.* 20, 213-219.
- 373 Pereira, C.I., Graça, J.A., Ogando, N.S., Gomes, A.M.P., Malcata, F.X. 2010. Influence of
374 bacterial dynamics upon the final characteristics of model Portuguese traditional cheeses.
375 *Food Microbiol.* 27, 339-346.
- 376 Pintado, A.I., Tavares, T.G., Tavaira, F.K., Malcata, F.X. 2010. Tradition versus modernism in
377 cheesemaking technology: a Portuguese case study encompassing plant coagulant, non-
378 bovine milks and adventitious microflora. *Aust. J. Dairy Technol.* 65, 128-134.
- 379 Regulation (CE) 1491/2003 of European Commission of 25 of August: Registration of the
380 Protected Designation of Origin “Torta del Casar” in the Register of Protected
381 Designations of Origin and the Protected Geographic Indications.
- 382 Roa, I., López, M.B., Mendiola, F.J. 1999. Residual clotting activity and ripening properties of
383 vegetable rennet from *Cynara cardunculus* in La Serena cheese. *Food Res. Int.* 32, 413-
384 419.

- 385 Sanjuán, E., Millán, R., Saavedra, P., Carmona, M.A., Gómez, R., Fernández-Salguero, J. 2002.
386 Influence of animal and vegetable rennet on the physicochemical characteristics of Los
387 Pedroches cheese during ripening. *Food Chem.* 78, 281-289.
- 388 Sousa, M.J., Ardö, Y., McSweeney, P.L.H. 2001. Advances in the study of proteolysis during
389 cheese ripening. *Int. Dairy J.* 11, 327-345.
- 390 Távaira, F.K., Malcata, F.X. 1998. Microbiological characterization of Serra da Estrela cheese
391 throughout its AOP region. *J. Food Prot.* 61, 601-607.
- 392 Veloso, A.C.A., Teixeira, N., Peres, A.M., Mendonça, A., Ferreira, I.M.P.L.V.O. 2004. Evaluation
393 of cheese authenticity and proteolysis by HPLC and urea-polyacrilamide gel
394 electrophoresis. *Food Chem.* 87, 289-295.
- 395 Vioque, M., Gómez, R., Sánchez, E., Mata, C., Tejada, L., Fernández – Salguero, J. 2000.
396 Chemical and microbiological characteristics of ewe's milk cheese manufactured with
397 extracts from flowers of *Cynara cardunculus* and *Cynara humilis* as coagulants. *J. Agric.*
398 *Food Chem.* 48, 451-456.
- 399 Visser, S. 1993. Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: an overview.
400 *J. Dairy Sci.* 76, 329-350.

401

402

403 Figure 1. Moisture content, and pH values during the process of “Torta del Casar” cheeses (1A).

404 Evolution of proteolysis parameters during the ripening of the cheese “Torta del Casar” (1B).

405

406 Figure 2. Evolution of Texture compression analysis (TCA) parameters during the ripening of the

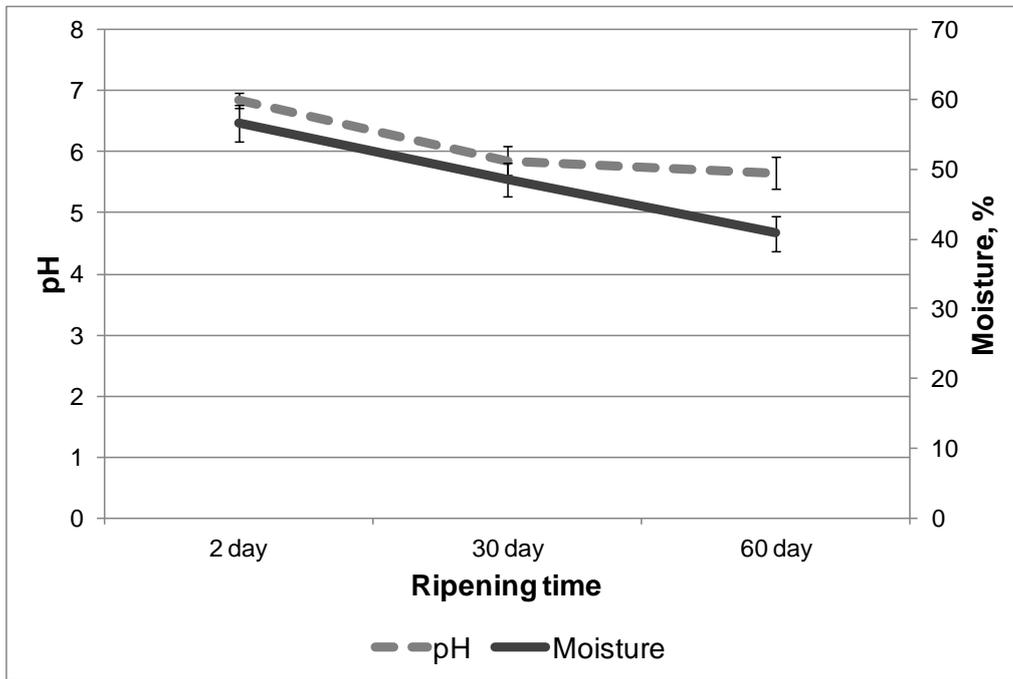
407 cheese “Torta del Casar” (2A) and texture spreadability analysis (TSA) parameters at 60 days of

408 ripening (2B).

409

410 Figure 1

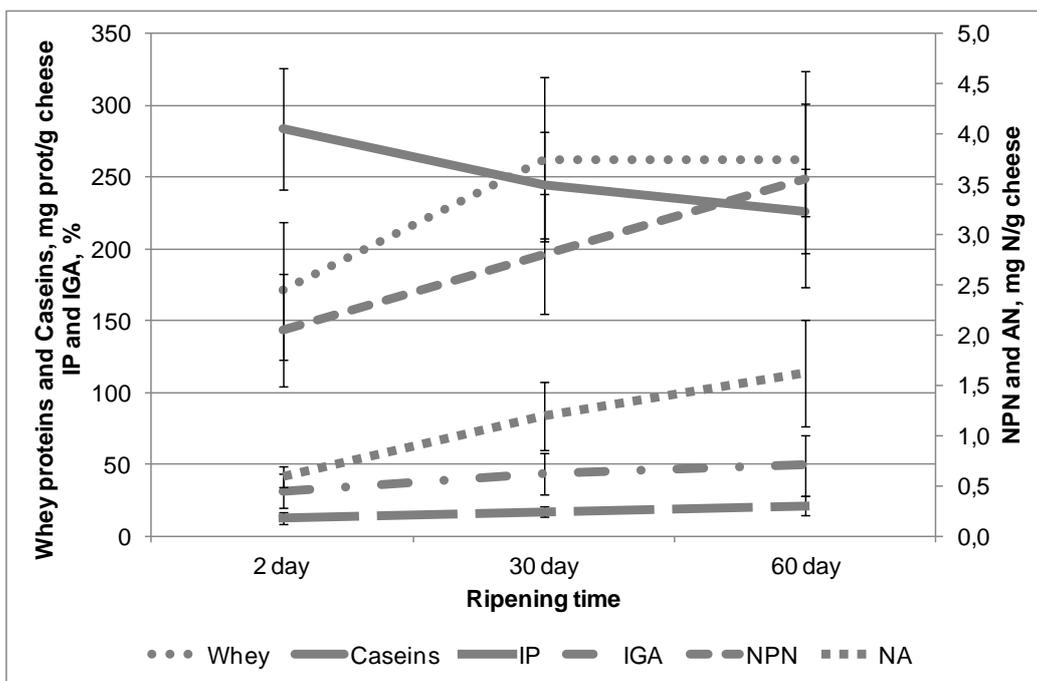
411 1A



412

413

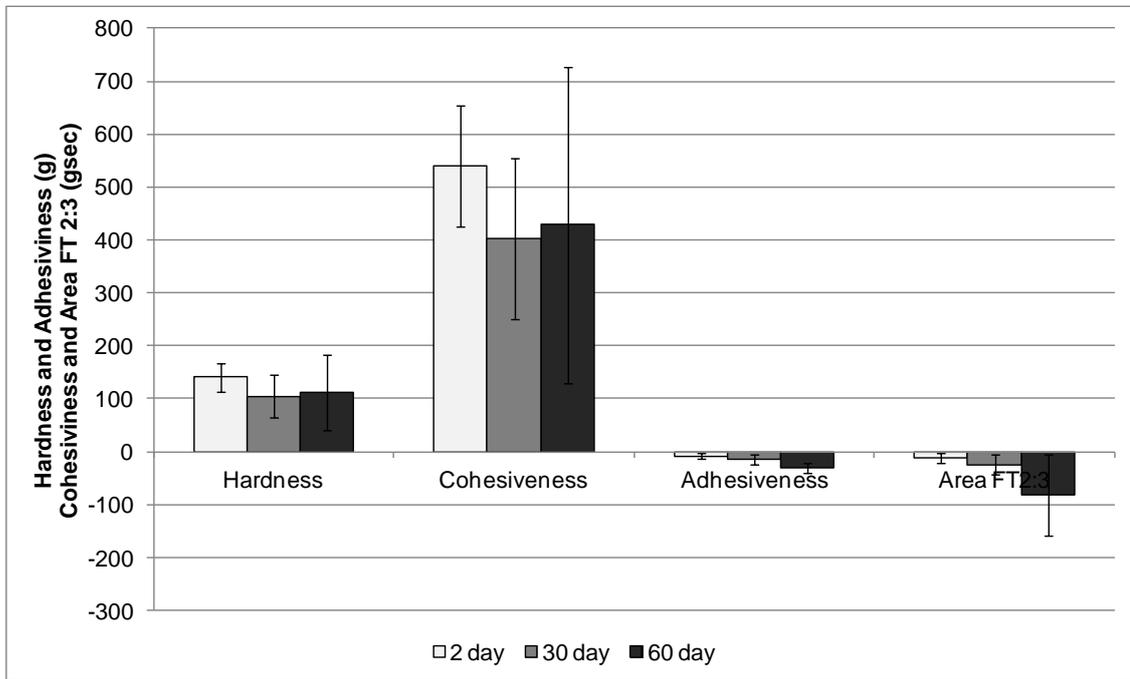
414 1B



415

416 Figure 2

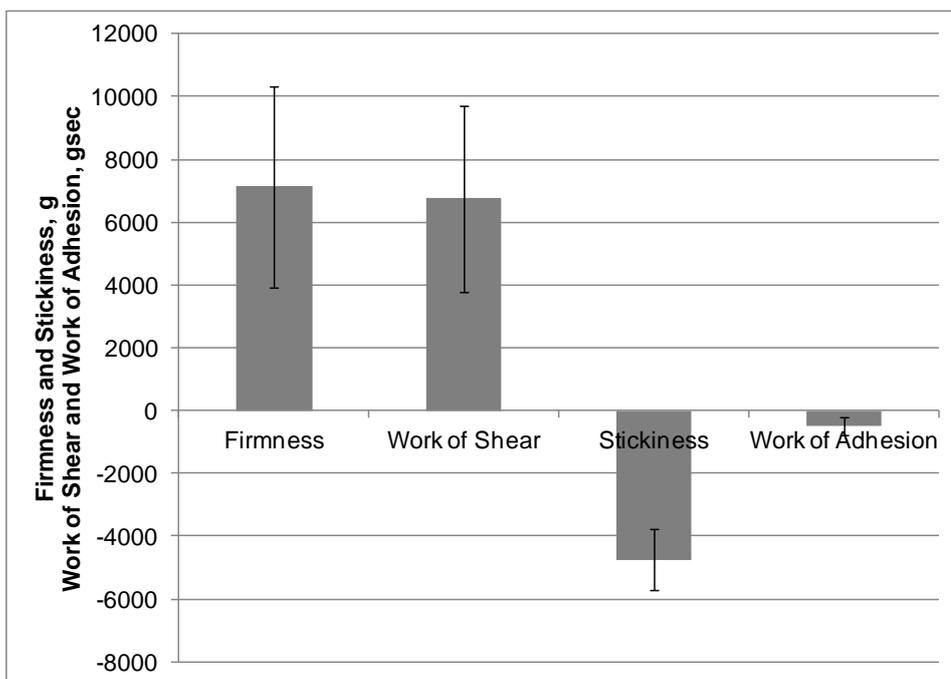
417 2A



418

419

420 2B



421

422 Table 1. Counts of the rennets and the raw milk (raw materials)

Descriptive Statistics	Vegetable rennets					Milk				
	N	Mean	SD	Min	Max	N	Mean	SD	Min	Max
VRBA	16	4,23	1,46	1,00	5,79	16	3,60	0,72	2,78	5,00
VRBG	16	4,37	1,91	0,60	6,90	16	3,52	0,62	2,70	4,74
PCA	16	5,28	1,53	2,48	8,70	16	5,95	2,34	4,00	11,72
PCA(psi)	16	4,67	1,81	< 1	7,15	16	0,90	1,79	< 1	4,30
MRS	16	2,74	2,29	< 1	5,28	16	4,15	0,88	3,25	5,43
M17	16	3,89	2,17	< 1	5,71	16	5,10	2,76	< 1	10,48
SB	16	1,83	1,34	< 1	3,75	16	3,58	0,78	2,60	5,83
BP	16	1,10	1,52	< 1	5,08	16	4,28	0,46	3,85	5,46
BP(con halo)	16	0,42	1,12	< 1	3,85	16	3,49	1,17	< 1	4,95
MSA	16	3,82	1,91	0,30	6,85	16	4,38	0,48	3,89	5,46
PDA(moho)	16	5,33	2,03	2,78	9,08	16	2,98	0,85	2,00	4,85
PDA(lev)	16	4,87	2,46	< 1	8,30	16	1,54	1,72	< 1	4,48
Pseudomona	16	2,00	2,18	< 1	5,36	16	2,66	1,55	< 1	4,48
SPS	16	0,14	0,53	< 1	2,00	16	0,79	0,97	< 1	2,00

423

424

425 Table 2. Correlations of the cheeses counts in at 2 days of ripening with the rennets and raw milk counts

	Vegetable rennet	Milk
VRBA	-0,287	-0,006
VRBG	0,197	-0,089
PCA	0,203	-0,013
PCA(PSI)	0,465+	0,002
MRS	0,356	0,448+
M17	0,421	-0,295
SB	0,543(*)	0,426
BP	0,116	0,165
MSA	0,135	0,059
PDA(MOHO)	-0,108	-0,279
426 PDA(LEV)	-0,423	-0,361

427 + P<0.01

428 * P<0.05

429

430 Table 3. Counts in cheeses along the ripening process (log CFU/g)

	2 days					30 days				60 days			
	N	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	Min	Max
VRBA	16	7.2	0.96	5.8	9.1	7.9	0.76	6.8	8.8	6.7	0.75	5.6	7.6
VRBG	16	7.3	1.05	5.7	9.0	7.9	0.94	5.9	9.1	6.8	0.68	5.7	7.6
PCA	16	8.9	1.20	6.7	11.7	9.4	0.41	8.8	10.2	9.4	0.65	8.5	11.1
PCA(psi)	16	8.2	1.08	6.0	9.8	9.3	0.48	8.3	10.2	9.3	0.66	8.7	11.1
MRS	16	8.0	1.14	5.8	9.8	9.1	0.49	8.4	10.3	8.9	0.51	8.5	10.4
M17	16	8.1	1.02	6.1	9.5	8.8	0.44	7.8	9.4	8.2	1.07	6.9	10.4
SB	16	6.7	0.92	5.3	7.5	7.6	0.38	7.0	8.4	7.6	0.42	7.0	8.3
BP	16	6.3	0.76	4.9	7.6	6.3	0.65	5.4	7.6	6.6	1.43	4.5	8.7
BP(con halo)	16	3.1	2.52	< 1	6.5	2.1	2.17	< 1	4.6	2.5	1.72	< 1	4.2
MSA	16	6.9	0.91	5.5	8.8	7.2	0.49	6.4	7.9	6.9	0.43	6.2	7.8
PDA(moho)	16	4.6	1.92	2.3	8.6	3.3	1.07	2.0	6.0	4.2	0.98	2.6	6.4
PDA(lev)	16	4.5	1.53	2.8	8.2	4.0	0.54	3.1	4.8	4.1	1.97	2.4	8.2
Pseudomona	16	3.5	3.61	< 1	7.6	7.7	0.56	6.9	8.7	6.7	0.42	5.9	7.3
SPS	16	1.5	1.53	< 1	4.0	1.1	1.58	< 1	3.6	0.3	0.74	< 1	2.0

431
432

433 Table 4. Correlations of microbiological counts with proteolysis parameters along the cheese ripening. (Only shown those data in which there was correlation)

	30 days				60 days					
	Whey	Caseins	NA	IGA	Whey	Caseins	NPN	NA	IP	IGA
VRBA					--(30)	++(2)		--(30)		--(30)
VRBG						++(60)				--(30)
PCA				--(30)		++(2)				
PCA(psi)										++(60)
MRS										++(60)
M17		--(30)						++(60)		++(60)
SB	++(30)		+++ (2, 30)	+++ (30)			+++ (30)		+++ (30, 60)	--(30)
BP				++(30)						
MSA					--(30)	++(30)		---(30)		--(30)
PDA(moho)	--(30)									
PDA(lev)					++(60)	--(60)				

+ positive correlation P<0.1
 ++ positive correlation P<0.05.
 +++ positive correlation P<0.01.
 - negative correlation P<0.1
 -- negative correlation P<0.05.
 --- negative correlation P<0.01.
 (2) microbial counts at 2 days
 (30) microbial counts at 30 days
 (60) microbial counts at 60 days

434

435

436

437

438 Table 5. Correlations of microbiological counts with Texture compression analysis (TCA) parameters (at 2, 30 y 60 days of ripening) and texture spreadability
 439 analysis (TSA) parameters (at 60 days of ripening). (Only shown those data in which there was correlation)

	TCA										TSA		
	2 days		30 days				60 days				60 days		
	Cohesiviness (g.seg)	Adhesiviness (g)	Hardness (g)	Cohesiviness (g.seg)	Adhesiviness (g)	Area F-T 2:3 (g.seg)	Hardness (g)	Cohesiviness (g.seg)	Adhesiviness (g)	Area F-T 2:3 (g.seg)	Work of Shear (gsec)	Adhesiviness (g)	Work of Adhesion (gsec)
VRBA							--(30)	--(30)	++(30)			---(30, 60)	---(30, 60)
VRBG							--(30)	--(30)				---(30, 60)	--(30)---(60)
PCA			--(30)	--(30)									
PCA(ps)					++(2)								
MRS					+++ (2)	++(2)						++(2)	
M17		--(2)			+++ (2) ++(30)	++(2)						+++ (60)	+++ (60)
SB					+++ (2)	+++ (2)						+++ (2)	
BP				++(30)	--(30)			++(30)		--(30)	++(30)	---(60)	---(60)
MSA													---(60)
molds					---(2)	---(2)						---(2)	--(2)
yeast	--(2)	++(2)			---(2)	--(2)						--(2)++(60)	--(2)

440 + positive correlation P<0.1

441 ++ positive correlation P<0.05.

442 +++ positive correlation P<0.01.

443 - negative correlation $P < 0.1$
444 -- negative correlation $P < 0.05$.
445 --- negative correlation $P < 0.01$.
446 (2) microbial counts at 2 days
447 (30) microbial counts at 30 days
448 (60) microbial counts at 60 days
449
450
451

452 Table 6. Correlations of microbiological counts with sensory analysis parameters. (Only shown those data in which there was correlation)

	no holes	elastic	spreadability	creaminess	viscosity	juiciness	acidity	Ewe cheese	Intensity	Kind of cheese "Torta del Casar"
VRBA							--(60)	++(2)		
VRBG						++(2)	--(60)			
PCA										
PCPsi				++(2)		++(2)	++(2)		++(2)	++(2)
MRS				++(2)	++(2)		++(2)		++(2)	++(2)
M17				++(2)			++(2,60)	+++ (30)	+++ (2)	+++ (2)
SB	--(30, 60)	---(60)							++(2)	++(2)
BP	--(30)	--(30)	++(2)	++(2)	+++ (2)					+++ (2)
MSA		--(30)			++(2)	++(2)				--(30)
PDAm	++(60)						--(2)		--(2)	--(2)
PDAlev		--(30)		--(30)		--(30)				

453 + positive correlation P<0.1

454 ++ positive correlation P<0.05.

455 +++ positive correlation P<0.01.

456 - negative correlation P<0.1

457 -- negative correlation P<0.05.

458 --- negative correlation $P < 0.01$.

459 (2) microbial counts at 2 days

460 (30) microbial counts at 30 days

461 (60) microbial counts at 60 days

462

463

464

V. DISCUSIÓN

V.1. Caracterizar los cardos silvestres recolectados en la región extremeña para la elaboración de la “Torta del Casar”.

Este trabajo ha permitido llevar a cabo la caracterización de las especies de cardos silvestres que crecen en Extremadura, tanto a nivel morfológico, como molecular, fenotípico y tecnológico. La DOP “Torta del Casar” autoriza el empleo de la especie de cardo *Cynara cardunculus* como cuajo para la elaboración de este tipo de queso. Por esta razón, una vez caracterizadas y diferenciadas las especies de cardo, el trabajo se centró en la caracterización de esta especie y en su capacidad para ser empleada como cuajo vegetal.

Las especies de cardo que se incluyen en este trabajo fueron seleccionadas porque crecen en Extremadura y presentan flores, que una vez recolectadas, secas y picadas, pueden ser confundidas entre sí. Las queserías que elaboran el queso “Torta del Casar” compran el cuajo listo para ser utilizado, es decir, flores de cardo secas y picadas, por lo tanto imposible distinguir si pertenecen a *C. cardunculus* o a alguna de las otras especies de cardo de la familia Asteraceae o a una mezcla de las mismas. El uso de un cuajo formado por flores pertenecientes a especies diferentes a *C. cardunculus* o a una mezcla de especies, puede conllevar a problemas en la elaboración del queso, lo cual redundaría en pérdidas económicas, además de suponer un fraude para la DOP “Torta del Casar”.

V.1.1. Caracterización morfológica

La toma de las muestras de las diferentes especies de cardo en campo se realizó según la guía de Valdés y col. (1987), utilizando esta guía para la clasificación y caracterización morfológica de las muestras. Se trabaja con las especies *Silybum marianum*, *Onopordum nervosum*, *Cirsium arvense*, *Cynara humilis*, *Cynara scolymus* y *Cynara cardunculus*, todas ellas pertenecientes a la familia Asteraceae, subfamilia Carduoideae, tribu Cynarae y subtribu Carduinae.

V.1.2. Caracterización genética

La caracterización molecular de las especies de cardo objeto de este estudio se realizó mediante las técnicas RAPDs y SSRs. En primer lugar se seleccionaron los cebadores más adecuados para cada una de estas dos técnicas y posteriormente se analizaron las muestras de cardo de las diferentes especies.

Se utilizaron 7 cebadores, los cuales fueron previamente empleados para la caracterización de diferentes cultivares (Sonnante y col., 2002; Lanteri y col., 2003; Portis y col., 2004; Hernández y col., 2010). El análisis de 7 cebadores RAPD-PCR produjo un total de 79 bandas distintas de PCR entre las tres especies de cardos, *Onopordum nervosum*, *Cynara cardunculus* y *Cynara humilis*. Estas bandas oscilaron aproximadamente entre 168 y 1406 pb. Con el cebador OPAE10 se obtuvieron perfiles con un gran número de bandas, de adecuada intensidad, obteniendo diferentes perfiles para cada especie estudiada. Se encontró que había diferencias entre muestras pertenecientes a la especie *C. cardunculus*. Las bandas oscilaron aproximadamente entre 208 y 1193 pb, y se obtuvieron un total de 14 bandas polimórficas. Debido a estos resultados, se descartaron los otros cebadores y se analizaron todas las muestras con el cebador OPAE10.

Para llevar a cabo la técnica SSR se usaron 10 microsatélites, previamente utilizados por Acquadro y col. (2005a, b) para la caracterización de las poblaciones naturales de *Cynara cardunculus*, L. Los análisis de las reacciones de 10 SSR produjeron un total de 71 bandas diferentes entre las tres especies de cardo estudiadas, *Onopordum nervosum*, *Cynara cardunculus* y *Cynara humilis*. Las bandas oscilaron aproximadamente de 140 a 1523 pb. Los resultados obtenidos con estos cebadores para las diferentes especies estudiadas no fueron coherentes con los de Acquadro y col. (2005a), salvo para el caso del cebador CMAFLP-08 para las plantas de *Cynara cardunculus*. El cebador CMAFLP-24 amplificó todas las muestras, resultando en diferentes perfiles de bandas para cada especie, e incluso aparecieron diferentes bandas entre muestras que pertenecían a *C. cardunculus*. Las bandas oscilaron entre 1120 y 140 pb, y se obtuvieron un total de 11 bandas polimórficas. Resultados similares fueron mostrados por Acquadro y col. (2005a) con las poblaciones de *C. cardunculus*. En este sentido, el análisis de las muestras recolectadas se llevó a cabo con el cebador CMAFLP-24.

Después de analizar los resultados obtenidos con las técnicas RAPD y SSR se encontró que los mejores perfiles, con el mayor número de bandas polimórficas se obtuvieron con los cebadores OPAE10 y CMAFLP-24 para cada una de las técnicas. Por esta razón, estos cebadores se eligieron para la caracterización de las muestras recogidas.

Con la técnica RAPD-PCR se compararon los perfiles de bandas de ADN de las muestras de cardos y las muestras patrón de las 5 especies, resultando tres grupos, uno de ellos contiene las muestras de la especie *O. nervosum*, otro agrupa las muestras de *C. humilis*, y el tercer grupo está compuesto por las muestras pertenecientes a *C. cardunculus*. Las muestras clasificadas morfológicamente como *Silybum marianum* y *Cirsium arvense* no se agruparon en ninguno de estos tres grupos, estando genéticamente muy cercanas, con un porcentaje de similitud del 85 % y cercanas a la especie *O. nervosum*.

El primero de estos grupos agrupa 9 de las muestras recolectadas con el patrón *O. nervosum* 07, con porcentajes de similitud del 55 %. Se distinguen tres subgrupos por diferencias en bandas secundarias, en concreto se diferencian entre sí por las bandas de 540 pb y la de 852 pb. El segundo de los grupos aglutina 17 muestras con el patrón de *Cynara humilis* 08, con porcentajes de similitud de 40 %. Todas las muestras mostraron perfiles similares de 5 bandas de pesos moleculares entre 1184 y 314 pb, pero se detectaron diferencias a nivel de bandas secundarias, que dividieron este grupo en 4 subgrupos. Las muestras del subgrupo 1 mostraron dos bandas de amplificación adicionales, de 442 y 380 pb. Las muestras del subgrupo 2 presentaron dos bandas secundarias de 813 y 756 pb. El subgrupo 3 mostró un perfil idéntico de 6 productos de amplificación, con pesos moleculares entre 1184 y 314 pb. Finalmente, el subgrupo 4, que fue el más alejado genéticamente del resto, con porcentaje de similitud de 40 %, mostró perfiles idénticos de tres bandas, con pesos moleculares de 442, 380 y 314 pb. Por otra parte, el tercer grupo engloba 78 muestras con el patrón *Cynara cardunculus*, que fue un 90 % diferente de los otros dos grupos, estando claramente diferenciados. Las muestras presentaron perfiles de 7 bandas comunes y varias diferencias en las bandas secundarias. Se encontraron tres subgrupos con más del 60 % de similitud. Por tanto, se deduce una gran variabilidad genética dentro de la población de *C. cardunculus*. Esta afirmación es consistente con las conclusiones de Portis y col. (2005).

Se obtuvieron árboles similares a partir de las muestras de cardos, mediante la técnica SSR. Se observan tres grupos mayores, que contienen cada una de las especies estudiadas, *O. nervosum*, *C. humilis* y *C. cardunculus*, y las muestras *Silybum marianum* y *Cirsium arvense* no se agruparon en ninguno de estos grupos. Estas dos muestras mostraron porcentajes de similitud mayores que con la técnica RAPD.

La distribución de cada muestra en diferentes subgrupos con la técnica SSR se debió también a diferencias en las bandas secundarias de baja intensidad, y fue muy similar a la obtenida con la técnica RAPD.

Con estos resultados se pone de manifiesto que ambas técnicas permiten caracterizar de una forma rápida y adecuada todas las muestras de cardos de la familia Asteraceae estudiadas. Ambos sistemas de marcadores mostraron que las tres poblaciones poseen un remarcable número de diferencias. El mayor grado de diferenciación genética se encontró entre las poblaciones de *C. cardunculus*, debido al mayor número de bandas polimórficas RAPD y SSR, que fueron encontradas en el grupo de *C. cardunculus*. Esta variabilidad genética encontrada especialmente para las poblaciones naturales de *C. cardunculus* (variedad *sylvestris*), puede traducirse en variaciones en los perfiles bioquímicos de los cuajos empleados en la elaboración del queso, afectando las características del producto final.

Se ha demostrado que estas técnicas pueden ser usadas como un método efectivo para conseguir la autenticidad y trazabilidad del cuajo por la DOP del queso “Torta del Casar”.

V.1.3. Caracterización fenotípica

La caracterización fenotípica de las diferentes especies de cardo de la familia Asteraceae se realizó en base al perfil de proteínas que contienen las flores de estas plantas, que son el órgano que se emplea para la obtención del cuajo vegetal en el proceso de elaboración del queso. Los perfiles de proteínas se analizaron con las técnicas SDS-PAGE y FZCE.

El análisis de los perfiles de proteínas de las diferentes especies de cardo estudiadas, llevado a cabo mediante la técnica SDS-PAGE, mostró un total de 15 bandas con unos pesos moleculares en el intervalo de 13 a 67 kDa. Se observan

diferencias cuantitativas en los densitogramas obtenidos para cada una de las especies de cardo estudiadas. El perfil de *C. cardunculus* presenta 9 bandas, las más intensas, de 16,7 y 28,3 kDa, y 13,5 y 30,2 kDa, corresponden a las cardosinas A y B, respectivamente. El resto de las bandas que presenta esta especie pertenecen a procardosina A (45 y 55 kDa) y procardosina B (60,2 kDa), como describe Ramalho Santos y col. (1997). La forma madura de cardosina A (31 kDa) se detectó en células del tejido calloso con una banda de 45 kDa y otra de 55 kDa. La banda de 45 kDa se observa frecuentemente y se ha descrito que corresponde a cadenas no disociadas de la enzima (Ramalho Santos, 1998). Respecto a la cardosina B, se detectó la banda de 64 kDa (60,2 kDa en nuestro estudio), que se corresponde con el precursor y la banda de 55 kDa, similar a la observada para cardosina A. Estos autores sugieren que la banda de 55 kDa puede corresponderse con una forma intermedia de cardosinas, aunque esta banda no fue detectada en flores de cardo (Ramalho – Santos, y col., 1997; Vieira, y col., 2001), sino en semillas o en hojas (Pereira, y col., 2008). La especie *Cynara scolymus* presenta un perfil de proteínas formado por 10 bandas polipeptídicas, en un rango de peso molecular de 13,5 a 60,2 kDa. Las bandas que corresponden a las cardosinas A y B mostraron la misma intensidad que las de *C. cardunculus*, mientras que la banda de 60,2 kDa fue significativamente menos intensa que la encontrada en *C. cardunculus* (Sidrach y col., 2005). Por otra parte, el perfil de proteínas de *Cynara humilis* queda definido por 5 bandas polipeptídicas, correspondiendo a las bandas características de cardosina A (16,7 y 30,2 kDa) y otras bandas menos intensas (55, 60,2 y 66,2 kDa), las cuales podrían corresponder a formas de procardosinas, como sugieren Ramalho Santos y col. (1998). En este perfil no se aprecian las bandas correspondientes a cardosina B, en concordancia con Esteves y col. (1995), que afirmaba que las flores de *C. humilis* no contienen cardosina B. Las cardosinas A y B representan las proteasas aspárticas mejor caracterizadas, junto con las cyprosinas (Brodelius y col., 1998; Cordeiro y col., 1994). Respecto a la especie *Silybum marianum*, su perfil mostró 3 bandas proteicas, dos de ellas de 35 y 64 kDa aproximadamente, no se encontraron en el resto de las especies estudiadas en este trabajo. Por último, el perfil de *Onopordum nervosum* se caracterizó por bandas de 30, 32, 59 y 67 kDa aproximadamente, las cuales no se observaron en los perfiles del resto de especies estudiadas. En este sentido, los diferentes perfiles de proteínas obtenidos con la técnica SDS-PAGE, permiten diferenciar las 5 especies de cardo pertenecientes a la familia Asteraceae estudiadas.

Los electroferogramas obtenidos al aplicar la técnica FZCE a las especies de cardo englobadas en este trabajo, mostraron un total de 24 picos bien definidos, encontrando diferencias cuantitativas y cualitativas entre las especies de cardo. El perfil de la especie *Silybum marianum* estaba definido por los picos 8, 9, 12 y 14, que no se encontraron en el resto de las especies de cardo. *Onopordum nervosum* mostró un perfil formado por los picos 1, 4, 6, 22 y 24, los cuales tampoco se observaron en el resto de las especies estudiadas. Los picos 11 y 15 fueron significativamente diferentes entre las muestras de *O. nervosum* y las especies del género *Cynara*. La especie *Cynara humilis* mostró un perfil compuesto por los picos 3, 5, 7 y 23, ausentes en los perfiles de las otras especies del género *Cynara*. El pico 15 fue significativamente mayor para *C. humilis* y *C. scolymus* respecto a *C. cardunculus*. El área del pico 16 fue mayor para las especies *C. cardunculus* y *C. scolymus* que para la especie *C. humilis*, mientras que el pico 21 fue significativamente superior para las muestras de la especie *C. humilis*. Por otra parte, las muestras de *C. cardunculus* y *C. scolymus* mostraron perfiles similares, de hecho, ambas especies mostraron perfiles definidos por los mismos picos, excepto el pico 15, que fue significativamente mayor para *C. scolymus* que para *C. cardunculus*. Esta similitud entre estas dos especies se justifica porque proceden de un ancestro común (Foury, 1989; Rottenberg y Zohary, 1996; Raccuia y col., 2004). El pico 11 de las especies del género *Cynara* podría incluir las cardosinas purificadas A y B (Ordiales y col., 2012). Sin embargo, otros picos, como 15, 16 y 17, podrían corresponderse a cardosinas con diferente carga, debido a su diferente nivel de glicosilación (Sidrach y col., 2005). Por tanto, estos resultados demuestran que el método FZCE puede discriminar las especies de cardo de la familia Asteraceae estudiadas. La efectividad de este método para discriminar entre variedades de otros vegetales ha sido previamente descrita para la autenticación de variedades de pimentón (Hernández y col., 2007) y de variedades de cereza tipo “Picota” (Serradilla y col., 2008).

Además, se empleó este método para estudiar la variabilidad en la especie *C. cardunculus*. Comparando los electroferogramas de esta especie se encontraron diferentes perfiles, lo cual permite dividir las muestras de *C. cardunculus*, recogidas en la campaña de 2006, en tres grupos. Estos tres grupos mostraron 9 picos con el mismo tiempo de retención, pero dos de los grupos mostraron 2 picos más, los picos 18 y 19. Estos tres grupos también se diferencian por las áreas de los picos que los definen.

Este método analítico podría emplearse para identificar el origen de las flores secas de los cardos empleados como cuajo en las queserías, con el fin de evitar fraudes, y garantizar la autenticidad del cuajo.

V.1.4. Caracterización tecnológica

Para estudiar la actividad proteolítica de los cuajos de las diferentes especies de cardo estudiadas se parte de los extractos acuosos obtenidos por maceración en agua de las flores secas y picadas. Se evaluó la capacidad de degradación de las caseínas de la leche, α , β , y κ -caseína, por parte de los extractos o cuajos. *Cynara cardunculus* hidrolizó α -caseína en un 89,83 %, mostrando una actividad proteolítica sobre esta caseína superior que el resto de las especies, salvo *C. scolymus*, que degradó α -caseína en un 80,56 %. En cuanto a la degradación de κ -caseína, las especies del género *Cynara* pudieron degradarla prácticamente en su totalidad, mostrando una actividad proteolítica superior que las especies *O. nervosum* (67,49 %) y *S. marianum* (44,92 %) para esta caseína. Respecto a β -caseína, la degradación por parte de *C. cardunculus* y *O. nervosum* fue ligeramente superior a la del resto de las especies estudiadas, aunque no se apreciaron diferencias significativas. Tavaira y col. (2001) afirmaron que *C. cardunculus* presenta mayor actividad proteolítica sobre α -caseína que sobre β -caseína, pero los valores encontrados por ellos fueron generalmente menores que los obtenidos en este trabajo. Cavalli (2005) afirmó que el extracto de *S. marianum* produjo una gran degradación de α -caseínas, y solo una degradación ligera de β -caseína, aunque en nuestro estudio observamos que esta especie degradó con mayor intensidad β -caseína. En ese sentido, Sousa y Malcata (1998) encontraron similares valores de degradación de α - y β -caseína por los extractos de *C. cardunculus*. En nuestro estudio los valores de actividad proteolítica de los extractos de *C. cardunculus* sobre las caseínas fueron mayores que los observados para el resto de las especies estudiadas.

Se realizó un análisis de componentes principales en base a los perfiles proteicos obtenidos con las técnicas SDS-PAGE y FZCE, y la actividad proteolítica sobre las caseínas de la leche, de las diferentes especies de cardo de la familia Asteraceae estudiadas. El primer eje explicaba el 22,38 % de la varianza y estaba definido por la actividad proteolítica sobre α y κ -caseína, las bandas SDS-PAGE de 16,7, 28,3, 30,2 y 60,2 kDa, y los picos FZCE 10, 11, 13, 15, 16, 17 y 20. El segundo eje, explica el 16,29

% de la varianza, y se define por los picos FZCE 3, 5, 21 y 23, las bandas SDS-PAGE de 45 y 55 kDa y la actividad proteolítica sobre β -caseína. Según este análisis de componentes principales, las muestras de las diferentes especies estudiadas se agruparon entre sí y se diferencian del resto, en base a las variables con las que se correlacionan cada una de ellas. De modo que las muestras de *S. marianum* se correlacionaban con los picos FZCE 8, 9, 12 y 14, y las bandas SDS-PAGE de 35 y 64 kDa. Por otro lado, las muestras de la especie *O. nervosum* parecen estar correlacionadas con los picos FZCE 1, 4, 6, 7, 22 y 24, y las bandas SDS-PAGE de 30, 32, 59 y 67 kDa. Las muestras que pertenecen a las especies del género *Cynara* no aparecen tan separadas entre sí, aunque se observan tres grupos diferenciados. Las muestras de la especie *C. humilis* se correlacionan con los picos FZCE 3, 5, y 21, las bandas SDS-PAGE de 37,3 y 55 kDa, y la actividad proteolítica sobre β -caseína. Se observa que las muestras de *C. scolymus* y de *C. cardunculus* se correlacionan con el resto de variables.

Debido a que la especie de mayor interés de las incluidas en este trabajo es *Cynara cardunculus*, por ser la especie autorizada por la DOP “Torta del Casar” para ser utilizada como cuajo vegetal, se profundiza en su caracterización tecnológica, partiendo de la variabilidad encontrada para esta especie, a nivel molecular y de perfiles proteicos. De modo que este trabajo es el primero que aborda la diferenciación entre y dentro de las poblaciones de *C. cardunculus*, lo cual resulta especialmente interesante en Extremadura, pues esta planta también se emplea como cuajo en la elaboración de otros quesos típicos de la región.

De los resultados obtenidos en este trabajo se deduce que la actividad coagulante de los extractos es una de las características que definen la calidad tecnológica del cuajo, por tanto se incluye un estudio de los factores que pueden influir en la actividad coagulante que presentan los extractos de las plantas de *C. cardunculus*. Concretamente se estudia la influencia de la concentración de extracto en la obtención del cuajo, el tiempo de maceración, la cantidad de cuajo que se aporta a la leche, el almacenamiento en refrigeración del extracto, así como la influencia en la actividad coagulante del año, la localización y el estado de maduración de la flor en el momento de su recolección.

En cuanto a la concentración del extracto, se observó que los extractos preparados a menor concentración presentaron menores valores de actividad coagulante, de forma que se comprobó que a mayor concentración (g flores secas y picadas/ml agua) del extracto, mayor actividad coagulante. Se aplicó la técnica SDS-PAGE a estos extractos para estudiar su perfil proteico y su actividad proteolítica sobre las caseínas y se observó que las muestras de extracto preparadas con mayor concentración, presentaron un perfil proteico con bandas con mayor intensidad que las muestras de menor concentración. Igualmente, el efecto de la concentración de extracto se reflejó en la actividad proteolítica del extracto sobre las caseínas, de forma que los extractos más concentrados degradaron las caseínas con mayor intensidad. La actividad coagulante del cuajo empleado es uno de los factores que influye sobre la mayor o menor degradación de las caseínas (Irigoyen y col., 2000).

Respecto a la influencia del tiempo de maceración en la actividad coagulante del extracto, se comparó la actividad coagulante de dos extractos, A30 y A49, a tres concentraciones diferentes, en cuatro tiempos de maceración.

Para la muestra de cardo A30, para la concentración de 0,65 g/100 ml, el mayor valor de actividad coagulante se obtuvo tras 4 horas de maceración, siendo superior significativamente al resto de los tiempos ensayados. Para los extractos preparados a la concentración 5 g/100 ml, el mayor valor de actividad coagulante se encontró tras 16 h de maceración, superior significativamente al valor encontrado tras 4 horas de maceración. En cuanto a los extractos preparados a la concentración 10 g/100 ml, no se encontraron diferencias significativas para los diferentes tiempos de maceración. Teniendo en cuenta todas las variables, el mayor valor de actividad coagulante para esta muestra de cardo se obtuvo con la concentración 10 g/100 ml, tras 1 h de maceración, y el menor valor para la concentración 0,65 g/100 ml, tras 2 horas de maceración.

Para el extracto preparado con la muestra de cardo A49, para las tres concentraciones ensayadas, los mayores valores de actividad coagulante se obtuvieron con los extractos preparados tras 4 horas de maceración. Con este extracto, considerando todas las variables ensayadas, se puede decir que el mayor valor de actividad coagulante se encontró para el extracto preparado con la concentración 10 g/100 ml tras 4 h de maceración, mientras que el valor más bajo lo presentaron los extractos de 0,65 g/100 ml, tanto a 1 h, como tras 16 h de maceración.

Parece que tiene más influencia sobre la actividad coagulante la concentración del extracto que el tiempo de maceración, ya que parece que con alta concentración se obtiene una alta actividad coagulante con menor tiempo de maceración.

Se aplicó la técnica SDS-PAGE a estos extractos y se observó la influencia de la concentración de los extractos en la intensidad de las bandas del perfil, siendo los perfiles con mayor intensidad los que corresponden a los extractos más concentrados (10 g/100 ml). En cambio, no se apreciaron diferencias en la intensidad de las bandas en base al tiempo de maceración de los extractos. En cuanto a la actividad proteolítica de estos extractos sobre las caseínas, se observó diferente degradación de las caseínas para extractos preparados con diferente concentración, sin encontrar diferencias por el tiempo de maceración.

Se estudió la influencia de la cantidad de cuajo añadido a la leche en la actividad coagulante, para lo que se ensayaron cuatro cantidades diferentes de extracto que se añade al sustrato de leche, con dos tiempos de maceración, para tres muestras de cardo. Para un mismo tiempo de maceración se observa que a mayor cantidad de extracto añadida, mayor actividad coagulante, con diferencias significativas entre las cantidades de extracto. Esta afirmación se puede aplicar a las tres muestras de cardo y los dos tiempos de maceración. En este caso parece que ejerce más influencia sobre la actividad coagulante la cantidad de extracto añadida a la leche, que el tiempo de maceración del extracto, de forma que la actividad coagulante de los extractos que se añaden a la misma cantidad fue estadísticamente igual entre sí, a pesar de haberse preparado con diferentes tiempos de maceración. Tan solo los extractos añadidos al 5 % de la muestra A208 fueron significativamente diferentes entre sí.

Tras analizar los resultados de actividad coagulante de las muestras de cardo, recogidas en tres años diferentes, tres estados de maduración y varias localizaciones, no se observan diferencias significativas entre los extractos preparados con las muestras para los diferentes años de recolección, los estados de maduración de la flor, ni considerando la localización donde fueron recogidas. Por tanto la actividad coagulante de un extracto no se influenciada por ninguna de estas tres variables. Se estudió el perfil proteico de 4 muestras de extracto, preparadas con la misma concentración, 5 g/100 ml H₂O, y el mismo tiempo de maceración, 1 hora. Se observa que las diferentes muestras presentan el mismo perfil en cuanto a bandas se refiere, pero no en la intensidad de

dichas bandas. Estas diferencias en la intensidad de las bandas de los perfiles proteicos se traducen en diferente actividad proteolítica sobre las caseínas, de modo que los perfiles con bandas más intensas, fueron los más proteolíticos. Ello significa que la actividad coagulante es diferente en cada una de las muestras de cardo recogidas.

Finalmente se estudió la influencia del tiempo de almacenamiento en refrigeración del extracto en su actividad coagulante. Para la concentración 0,65 g/100 ml, la actividad coagulante de los extractos fue significativamente inferior tras 1 día en refrigeración, respecto al extracto recién preparado y tras 7 días refrigerado. Sin embargo, para la concentración 7 g/100 ml, el extracto que mostró mayor actividad coagulante fue el que estuvo 1 día refrigerado, diferente significativamente al resto, mientras que la actividad coagulante más baja se encontró para el extracto recién preparado. Con las concentraciones del extracto, 5 g/100 ml y 10 g/100 ml, se observa que la actividad coagulante del extracto aumenta con el tiempo de refrigeración, existiendo diferencias significativas entre los extractos. Por tanto parece que la actividad coagulante de los extractos no se reduce al mantenerlos en refrigeración al menos durante 7 días, pudiendo observar incluso un incremento en la actividad coagulante. Tavaira y col. (2001) estudiaron los efectos del almacenamiento y liofilización de los extractos de *Cynara cardunculus* en la degradación de caseínas ovinas y caprinas. Observaron que la actividad coagulante tiende a disminuir con el tiempo de almacenamiento, de forma que extractos, almacenados a 4° C mostraron una disminución del 65 % de su actividad coagulante tras 4 semanas, con una pérdida del 22 % en la segunda semana. Afirman que la actividad proteolítica sobre α - y β -caseína aumentaba tras 1 semana en refrigeración y disminuía entre la semana 1 y 2 de almacenamiento.

V.2. Evaluar la influencia que los diferentes años y estadios de maduración en la recolección del cardo ejercen sobre las características sensoriales de las tortas.

Teniendo en cuenta la gran variabilidad encontrada entre plantas de *Cynara cardunculus* a nivel molecular y de perfil de proteínas, se pretende estudiar la influencia de esta variabilidad en las características del producto final, ya que esta variabilidad puede ser una de las razones de la falta de homogeneidad que se relaciona con el queso “Torta del Casar”. Así mismo se plantea la necesidad de conocer si otras variables,

como el año de recolección, y el estado de maduración de la flor en el momento de recolección, influyen en la heterogeneidad del cuajo y por tanto, del queso.

Este estudio se basa en el análisis de perfiles de proteínas de los extractos acuosos de 16 muestras de plantas diferentes de *C. cardunculus*, los cuales se obtuvieron aplicando dos técnicas, FZCE y SDS-PAGE. Para investigar el potencial del método FZCE para controlar la calidad tecnológica de los extractos acuosos, los parámetros analíticos fueron evaluados y comparados con aquellos obtenidos con la técnica SDS-PAGE.

Con las 16 muestras de cardo mencionadas se elaboraron 16 lotes de quesos tipo “Torta del Casar”, a través de los que se estudió la influencia de las diferencias en las propiedades tecnológicas de los cuajos en las características de los quesos.

La resolución y los tiempos de migración para las proteínas solubles en metanol fueron apropiadas para usarlas con el protocolo de FZCE propuesto. Las proteínas fueron resueltas en 20 minutos y separadas en 18-22 picos y hombros bien definidos. Sólo se estudiaron los 10 picos más relevantes del perfil de proteínas. Respecto a los parámetros analíticos, se encontró que el método FZCE ofrece buena repetitividad de los CMT con coeficientes de variación (RSD %; $n = 5$) de $< 2\%$ para la mayoría de los compuestos proteicos analizados. Según el CMT, las cardosinas purificadas A y B, estarían incluidas en el pico 4. Sin embargo, otros picos como el 3, 6 y 7 podrían corresponder a cardosinas con diferente carga, debido a los diferentes niveles de glicosilación (Sidrach y col., 2005). De hecho, los picos mencionados mostraron simetría y espectro de absorbancia similares a los de las cardosinas purificadas. Los resultados muestran que el protocolo FZCE propuesto para el ensayo de proteínas solubles en metanol es un método potencialmente útil para controlar la calidad tecnológica de los extractos acuosos usados como cuajo en la elaboración de la “Torta del Casar”.

Respecto a la técnica SDS-PAGE, los densitogramas muestran un total de 9 bandas polipeptídicas diferentes, con un peso molecular en el rango de 13,5 a 66,2 kDa. El paso de precipitación de proteínas mediante cloroformo en el procedimiento de extracción de proteínas solubles en metanol para análisis de CZE conlleva una pérdida de la fracción apolar de la proteína, respecto al extracto de proteína entera para el análisis SDS-PAGE. Por tanto, la resolución de más proteínas mediante CZE que mediante PAGE podría ser

atribuida al método. A pesar de la menor efectividad de la técnica SDS-PAGE respecto a FZCE a la hora de discriminar variedades vegetales, ha sido empleada por varios autores con este fin (Cancalon, 1995; Hernández y col., 2006; Manabe, 1999). En nuestro estudio hay relevantes diferencias en todos los perfiles polipeptídicos de proteínas de las 16 muestras de extractos acuosos estudiados. Por tanto, el análisis de proteínas de cardo mediante SDS-PAGE podría ser también una herramienta potencialmente útil para caracterizar las propiedades tecnológicas de este cuajo vegetal.

Se estudió la relación entre las actividades coagulantes y proteolíticas de los extractos acuosos de las muestras de cardo de diferentes localizaciones, años de recolección y estados de maduración de la flor. Los valores de actividad coagulante oscilaron entre 0.118-0.169 y 0.149-0.347 UR/ml para 1 hora y 24 horas de maceración, respectivamente. Tavaría y col. (2001) obtuvieron valores de actividad coagulante en torno a 18 UR/ml para extractos 15 veces más concentrados de *Cynara cardunculus* recogidos en Portugal. Estos autores también encontraron una mayor actividad proteolítica sobre α que sobre β -caseína, pero los valores de porcentajes de degradación fueron generalmente más bajos que los encontrados en nuestro estudio. Respecto al factor investigado (estado maduración, localización y año de recolección) no se encontraron diferencias significativas en los valores de actividad coagulante y actividad proteolítica sobre fracciones de caseínas, aunque las muestras en el estadio b de maduración mostraron el mayor valor medio de degradación de β -caseína ($P < 0,01$). Un resultado similar fue encontrado para muestras de la localización “Ctra. Mérida – Madrid” en el caso de la degradación de k-caseína. Cordeiro y col. (1994) estudiaron las actividades proteolítica y coagulante de extractos de flores maduras recogidas en 8 localizaciones diferentes de Portugal, las cuales mostraron alguna variación en la actividad proteolítica, mientras la actividad coagulante fue esencialmente la misma para todos los extractos. Por tanto, se ha demostrado que estos factores son ineficaces como criterio para seleccionar las flores de *Cynara cardunculus* que son apropiadas tecnológicamente para la producción de cuajo vegetal en la elaboración de “Torta del Casar”.

Respecto a la relación del estado de maduración de la flor con el perfil CE y la intensidad de las bandas SDS-PAGE de las muestras de cardos, en general no se apreciaron diferencias relevantes en los electroferogramas FZCE, sólo el pico 9 fue más alto en las muestras del estado b. Resultados similares fueron obtenidos con los

densitogramas SDS-PAGE dado que sólo la banda proteica 4, de peso molecular aparente 32 kDa mostró diferencias, en este caso, siendo más intensa para los cardos recogidos en el estado inicial. Esta banda podría corresponderse a la subunidad α de cardosina B (Sousa y Malcata, 1998). Otras bandas fueron cuidadosamente identificadas por sus pesos moleculares como procardosinas (66,2 and 60,2 kDa), forma intermedia de cardosina (38 kDa), otra α -subunidad (30,2 kDa) de cardosinas y β -subunidades de cardosinas (16,7 y 13,5 kDa) (Sampaio y col., 2008; Verissimo y col., 1996). Sin embargo, estas bandas de proteínas también pueden incluir otras enzimas presentes en el tejido del cardo (López-Molina y col., 2003).

Considerando las correlaciones entre los parámetros analíticos (áreas de los picos CE e intensidades de las bandas SDS-PAGE) y las actividades coagulante y proteolítica, se puede afirmar que las áreas de los picos 3+4 y 6 están fuerte y positivamente correlacionadas ($P < 0,01$) con los valores de la actividad coagulante tras 1 hora de maceración y con la degradación de β y k-caseína respectivamente. Además la suma de las áreas de los picos estaba positivamente correlacionada con la degradación de β -caseína. Según sus valores de actividad proteolítica o de degradación de las caseínas, los picos arriba mencionados pueden incluir cardosinas activas o sus precursores. Dado que la cardosina B tiene una especificidad más amplia (como pepsina) que cardosina A (como quimosina) (Verissimo y col., 1996), los picos 3+4 y 10, correlacionados con la degradación de k-caseína, pueden relacionarse con cardosina A, mientras que los picos 6 y 9, correlacionados con la degradación de β -caseína, pueden relacionarse con cardosina B.

Respecto al análisis de bandas SDS-PAGE, la intensidad de las bandas de 66,2 y 20,7 kDa mostraron fuerte correlación con la degradación de β -caseína, mientras que las banda 8, de 16,7 kDa, probablemente incluye β -subunidades de cardosina A, estaban positivamente correlacionadas con actividad coagulante. Estos resultados mostraron que los métodos CE y SDS-PAGE podrían ser útiles a priori para la caracterización tecnológica de los extractos acuosos de *Cynara cardunculus*. Por ello, es necesario conocer el impacto del cuajo vegetal con diferentes perfiles CE y SDS-PAGE en las propiedades sensoriales de los quesos “Torta del Casar”.

Para conseguir este propósito se elaboraron 16 lotes de quesos tipo “Torta del Casar”, cada uno con una de las muestras de cardo (*C. cardunculus*) estudiadas y se analizaron, entre otros aspectos, los atributos sensoriales de los quesos obtenidos.

El análisis de componentes principales (PCA) de los atributos descriptivos sensoriales, la puntuación general, y los perfiles CE y SDS-PAGE mostraron diferencias importantes entre las muestras de quesos elaborados. El primer eje explicaba el 21,45 % de la varianza y estaba principalmente definido por la intensidad del flavor y la persistencia, y sabor picante, astringente y amargo, pero también por los descriptores de textura como blandura (lo contrario que dureza) y untabilidad. Un incremento en la valoración de estos atributos podría estar parcialmente relacionado con la actividad proteolítica no específica del cuajo vegetal, pero también con otros factores como la actividad proteolítica microbiana. De hecho, no se encontraron correlaciones relevantes entre ningún pico importante del perfil CE o las bandas del perfil obtenido mediante SDS-PAGE y PC1. El segundo eje (PC 2; 17,17 % de la varianza) incluye la aceptabilidad global, viscosidad, jugosidad y en menor medida, la cremosidad, junto con el pico 3+4 de CE y la banda SDS-PAGE de 16,7 kDa, mientras que el descriptor de flavor desagradable, junto con varias bandas SDS-PAGE (13,5; 30,2; 32,0 y 60,2 kDa). Como ha sido mostrado anteriormente, el pico CE 3+4 y la banda SDS-PAGE de 16,7 kDa también mostraron una fuerte correlación con la actividad coagulante, como el pico CE 6. Sin embargo, este último pico no se correlacionó positivamente con los descriptores de la aceptabilidad global y la cremosidad. Por el contrario, la relación entre la aceptabilidad global y el pico CE 6 fue negativa, según el análisis de correlación (P value $<0,1$) y PC3 (14,41 % de la varianza). Con el propósito de confirmar los picos 3+4 y 6 como marcadores de control de calidad, se empleó un método de regresión de mínimos cuadrados (PLSR). El modelo ($r = 0,626$) indica que el 39,2 % de la variación del descriptor cremosidad podría ser predicho a partir de las áreas de los picos CE seleccionados. Así mismo, el modelo para la aceptabilidad global ($r = 0,650$) indicó que hasta un 42 % de esta variación podría ser predicha a partir de estos picos marcadores. Por el contrario, el análisis mediante PLSR la correlación de las bandas SDS-PAGE con la actividad proteolítica y coagulante no mostraron buenos resultados.

Como conclusión de este apartado cabe destacar que el protocolo de extracción de proteínas solubles en metanol, de extractos de flores de *C. cardunculus* y el procedimiento de análisis de FZCE, constituyen un procedimiento rápido, económico y

eficiente para la caracterización tecnológica del cuajo vegetal en el procesado de “Torta del Casar”. Por tanto, proponemos que esta técnica podría ser usada para el control de calidad rutinario del cuajo vegetal usado en la elaboración del queso con DOP “Torta del Casar”.

V.3. Estudiar las modificaciones en las características físico – químicas, microbiológicas y sensoriales que la utilización de los diferentes cardos recolectados generan en las tortas elaboradas.

En primer lugar se estudió la influencia de las características tecnológicas de los cuajos en la textura del queso “Torta del Casar”, así como en los parámetros relacionados con la proteólisis del queso a lo largo de su maduración y las consecuencias a nivel sensorial. Finalmente se recoge la influencia de la microflora presente en el queso a lo largo del proceso de maduración del queso, tanto en la textura, como en el perfil de compuestos volátiles.

V.3.1. Influencia de las propiedades tecnológicas del cuajo en la textura del queso Torta del Casar.

Las diferencias detectadas en las propiedades tecnológicas de los cuajos, no se muestran a nivel de maduración del cardo o la localización, observando una alta variabilidad intra-grupo en ambos factores, como se comentaba anteriormente. En este estudio, la degradación de α -caseína osciló de 24,39 (muestra M15) al 100 % (muestras M1 y M3), mientras que la degradación de β -caseína y κ -caseína osciló entre 4,32 – 91,55 % y 4,21 – 98,43 % respectivamente. Tavaira y col. (2001) encontraron mayor actividad proteolítica sobre α y β -caseína. Silva y Malcata (1999) también observaron que α_s -caseínas eran hidrolizadas más rápido que β -caseína en ensayos *in vitro*. Esta observación es comparable con lo que ocurre en el queso, dado que ha sido afirmado que β -caseína es menos susceptible a la proteólisis que α_s -caseínas en la elaboración de quesos de leche cruda de oveja, en la que se emplean extractos de *C. cardunculus* como cuajo (Sousa y Malcata, 1997; Roa y col., 1999).

Se correlacionaron las características tecnológicas de los cuajos con los parámetros tiempo de corte, rendimiento de cuajada y las características físico –

químicas de los quesos a los 2 días tras su elaboración. El tiempo de corte osciló entre 35 y 75 minutos y mostró una correlación negativa con la actividad coagulante de los extractos tras 24 h de maceración. Sin embargo, este parámetro estaba positivamente correlacionado con la actividad proteolítica inespecífica sobre las caseínas. Aunque algunos estudios se han realizado sobre las propiedades gelificantes de las proteasas presentes en los coagulantes vegetales, no hay datos disponibles respecto a las propiedades de cada cardosina, y su contribución independiente a la actividad coagulante global y las propiedades gelificantes. Silva y col. (2003) mostraron que las cardosinas exhiben un comportamiento reológico diferente entre ellas, y también si se comparan con la quimosina. Este conocimiento es importante con el fin de reducir racionalmente la variabilidad en la elaboración de los quesos, empleando extractos de *C. cardunculus*.

El valor medio de rendimiento de la cuajada para los quesos estudiados fue bajo (23,8 %) confirmando resultados previos (Agboola y col., 2009). Mas Mayoral y col. (1991) encontraron rendimientos en queso ligeramente inferiores que el obtenido en este estudio, en torno a 16,5 y 20 %. Este parámetro no está claramente unido a las actividades coagulantes, pero mostró una correlación positiva con la degradación de κ -caseína, la primera fase de la coagulación de la leche.

Con respecto a los parámetros físico-químicos de los quesos frescos, los valores medios de humedad y pH fueron de 56,61 % y 6,85, respectivamente, mientras que la a_w osciló entre 0,96 a 0,99. Sanjuán y col. (2002) estudiaron la influencia del cuajo vegetal en las características físico – químicas del queso “Los Pedroches” durante la maduración. A los 2 días de maduración la humedad de los quesos era 51,63 %, el valor de pH era 5,6 y el de la a_w , de 0,975. Los valores de pH estaban positivamente correlacionados con la actividad proteolítica de los extractos acuosos, lo cual se atribuye al hecho del efecto buffer generado por los productos de la hidrólisis de proteínas (Shammet y col., 1992).

A lo largo del proceso de maduración, los valores de los parámetros físico – químicos de los quesos evolucionaron. El pH de los quesos disminuyó a lo largo de la maduración, moderadamente al principio, de 6,85 a 5,86, alcanzando valores de 5,65 a los 60 días de maduración. El pH es de gran importancia en la maduración del queso debido a su influencia en la actividad proteolítica. Estos cambios de pH pueden indicar

la relevante actividad metabólica de las bacterias ácido lácticas en este tipo de queso de oveja. La actividad proteolítica en el queso está determinada principalmente por el nivel y tipo de cuajo residual, el ratio sal/humedad, la temperatura de maduración y los cambios de pH durante la maduración (Lawrence y col., 1987). Heimgartner y col. (1990) observaron que durante la maduración del queso el pH alcanzaba el valor de 5,31, que está próximo al óptimo para la actividad del cuajo vegetal.

A lo largo del periodo de maduración, se observó una disminución del peso del queso, de 1,35 % a los 2 días de maduración, hasta 33,41 % menor peso del queso al final de la maduración. El valor medio de humedad osciló entre 56,61 (2 días de maduración) a 40,81 (60 días de maduración). La actividad de agua de los quesos disminuyó progresivamente durante la maduración, desde 0,972 a 0,952 (30 días) y a 0,946 al final del proceso. Los resultados son similares a los obtenidos para otros quesos de pasta blanda (Roa y col., 1999; Sanjuán y col., 2002).

Para los porcentajes de proteína y grasa, los valores medios fueron 16,72 y 25,31 respectivamente, en consonancia con otros autores (Mas Mayoral y col., 1991). Además, la proteína total mostró correlación positiva con la actividad coagulante del cuajo usado tras 1 h de maceración, junto con una relación negativa con los valores de humedad. Una cuajada mejor gelificada asociada a altos valores de actividad coagulante del cuajo explicaría estos resultados.

Los recuentos medios de bacterias viables totales y LAB fueron superiores a 8 log ufc/g durante todo el proceso de maduración, mostrando alta variabilidad en etapa inicial (2 días de maduración). Los recuentos de aerobios mesófilos se incrementó desde 9,3 a 10,4 log ufc/g en el queso tras 60 días de maduración en todos los lotes y de 8,2 a 9,3 log ufc/g en el caso de psicrotrofos. Respecto a staphylococos los recuentos permanecieron estables hasta el final del proceso en niveles en torno a 6,5 log ufc/g. En el caso de GPCP cocci, los recuentos de este grupo microbiano durante la maduración presentaron valores constantes cercanos a 7 log ufc/g, y no se observó relación entre las actividades coagulantes del extracto y los recuentos de estos grupos microbianos. Los recuentos de TVC, LAB y GPCP cocci fueron similares a los encontrados en otros quesos de pasta blanda elaborados con cuajo vegetal. LAB aparecen como el grupo microbiano predominante en el queso Serra da Estrela (Tavaira y col., 1998), en los que finalmente alcanzaron valores de 10^7 en el momento de su consumo (Pintado y col.,

2010). Este crecimiento de LAB es coherente con la evolución del pH durante el proceso. De la misma forma, los recuentos de Micrococaceas y LAB se mantuvieron constantes en quesos elaborados con *C. cardunculus* como cuajo vegetal, con recuentos en torno a 5,3 log ufc/g para las primeras y de 8,7 log ufc/g para LAB. (Galán y col., 2012). Obviamente, considerando las características del cuajo vegetal, estos altos niveles de microorganismos durante la maduración pueden jugar un papel relevante en el desarrollo de las características sensoriales de “Torta del Casar”, incluyendo la textura.

En cuanto a los cambios en la textura a lo largo de la maduración, los valores de dureza y cohesividad disminuyeron, principalmente al final de la maduración, mientras que la adhesividad y el área F-T 2:3 mostraron los valores más bajos a los 30 días de maduración. Los valores encontrados en este estudio están en consonancia con los observados por otros autores en quesos elaborados con cuajo vegetal. En el caso de la dureza y la adhesividad, son mucho más bajos que en quesos elaborados con cuajo animal (Agboola y col., 2009). Estos valores medios pueden ser atribuidos a la gran proteólisis en estos quesos cuajados con el cardo *C. cardunculus*. Las diferencias encontradas entre las propiedades tecnológicas del cuajo vegetal empleado pueden condicionar las características sensoriales de “Torta del Casar”.

El análisis de Componentes Principales de los atributos sensoriales, puntuación global, parámetros de textura, y otras propiedades tecnológicas de los cuajos, mostró grandes diferencias entre las muestras de quesos elaborados con diferentes cuajos tras 60 días de maduración. El primer eje explica el 29,83 % de la varianza y estaba definido principalmente por descriptores sensoriales como la blandura (contrario a la dureza), untabilidad, viscosidad, jugosidad y cremosidad, pero también por la actividad coagulante del cuajo después de 24 h de maceración, y en menor medida, la aceptabilidad global. Concretamente, los valores de los descriptores de viscosidad y cremosidad y aceptabilidad global en el análisis sensorial de los quesos mostraron correlaciones positivas de forma significativa con la actividad coagulante del cuajo tras 24 h de maceración. Por tanto, una alta valoración de estos atributos puede estar parcialmente relacionada con la actividad coagulante del cuajo, pero también con otros factores como la actividad proteolítica microbiana (Macedo y col., 1996; Tavaira y Malcata, 2003). Con respecto a la actividad proteolítica de los extractos sobre las

caseínas, no parecen estar claramente relacionadas con ningún PC y su variabilidad explicada se distribuye por los tres PCs estudiados.

Los ejes segundo y tercero (28,30 y 11,57 % de la varianza respectivamente) definieron la mayoría de los parámetros de textura y en menor medida la aceptabilidad global y la degradación proteolítica de las caseínas *in vitro* por el extracto acuoso. Una correlación significativa negativa existe entre la degradación de caseínas *in vitro* de los cuajos y los parámetros del análisis de la untabilidad (textura), firmeza y trabajo de corte de los quesos con 60 días de maduración, evidenciando la influencia de las características del cuajo en las propiedades de la textura de “Torta del Casar”. Este efecto se traslada a la aceptabilidad global, pero no estaba claramente relacionado con los atributos descriptivos del análisis sensorial. Incluso un descriptor sensorial como la cremosidad estaba localizado en posición opuesta a la degradación de β -caseína respecto al eje PC1, mostrando una correlación negativa. Es posible que un incremento de la actividad inespecífica sobre las micelas de caseínas afecte al proceso de coagulación en la elaboración del queso, resultando en un producto menos cremoso.

Con el propósito de confirmar la influencia de las propiedades tecnológicas del cuajo vegetal en la calidad sensorial de “Torta del Casar”, se empleó el método de regresión parcial de mínimos cuadrados (PLSR). El modelo ($r = 0,688$) indica que un 47,4 % de la variación en el parámetro de textura “trabajo de untar” del queso podría ser predicho a partir de la degradación de las caseínas del cuajo, específicamente la actividad contra α -caseína, y el ratio de degradación κ -caseína/ β -caseína.

De este apartado se puede extraer la conclusión de que las diferencias en las actividades coagulante y proteolítica de los cuajos empleados en la elaboración de quesos de pasta blanda tienen un importante impacto en los parámetros físico-químicos de los quesos en la fase inicial, así como en la textura y el análisis sensorial en el producto final. La actividad coagulante tras 24 h de maceración y la intensidad de degradación de β -caseína han sido relacionadas con la cremosidad como parámetro descriptivo. Por otro lado, la capacidad de degradación de las caseínas de los extractos condiciona los parámetros de untuosidad, como la firmeza y el trabajo de untar. Por tanto, se propone el uso de la actividad proteolítica y coagulante del cuajo (con 24 h de maceración) para el control de calidad rutinario del cuajo vegetal empleado en la elaboración de los quesos bajo la Denominación de Origen Protegida “Torta del Casar”.

V.3.2. Influencia de las propiedades tecnológicas del cuajo en la proteólisis del queso “Torta del Casar”

Con el objetivo de estudiar la influencia de las características tecnológicas del cuajo vegetal (*C. cardunculus*) en la proteólisis generada en el queso y sus características al final de la maduración, se parte de la clasificación de los 16 cardos empleados para la obtención de los cuajos, con los que se elaboraron los 16 lotes de quesos, en base a su actividad proteolítica.

Se obtuvieron cinco clusters o grupos. Los cardos englobados en el cluster 1 (M4, M5, M8, M12, M14) se caracterizan por una fuerte degradación sobre α y κ -caseína (84 y 81% respectivamente), mientras que degradaron de forma moderada β -caseína (54%). El cluster 2 (M1, M2, M3, M6, M7, M10) agrupa a los cardos con moderada actividad proteolítica sobre β -caseína (67%), que degradaron con mucha intensidad α y κ -caseína (88 y 83% respectivamente). Los cuajos agrupados en el cluster 3 (M16) degradaron moderadamente κ -caseína (54%), mientras que la degradación de α - y β -caseína fue intensa (93% y 92%). La degradación de α -caseína fue intensa (82%), moderada – alta en el caso de β -caseína (70%), para los cuajos del cluster 4 (M9, M11), sin embargo degradaron κ -caseína con menor intensidad (23%). Por último, los cuajos del cluster 5 (M13, M15) degradaron α -caseína moderadamente (39%), mientras que mostraron una baja actividad proteolítica sobre β y κ -caseína (10 y 9%, respectivamente).

Atendiendo a la actividad coagulante media de los cuajos englobados en cada cluster, los mayores valores fueron observados en los cluster 1 y 5, tanto tras 24 h de maceración (0,269 RU/ml; 0,224 RU/ml). Los cluster 2 y 3 presentaron los valores más bajos de actividad coagulante tras 24 h de maceración (0,163 y 0,149 RU/ml). Tras 1 h de maceración de los extractos, los valores más altos de actividad coagulante se encontraron en los cluster 4 y 5 (0,156 RU/ml; 0,159 RU/ml), mientras que los valores más bajos de actividad coagulante se encontraron para los cluster 2 y 3 (0,134 RU/ml; 0,131 RU/ml).

Mediante el análisis de Componentes Principales se relacionaron los parámetros proteolíticos del queso a los 2 días de maduración con la actividad proteolítica y la actividad coagulante de los cuajos empleados. El primer eje (PC1) explica el 35,25 % de la varianza y fue definido principalmente por los parámetros de degradación de α , β y κ -caseínas, el tiempo de corte y el rendimiento encontrados en el queso a los 2 días de maduración, mostrando una correlación positiva entre ellos. El segundo eje (PC2, 14,33 % de la varianza) está relacionado con la actividad coagulante de los cuajos. Los lotes 1, 2, 3, 6, 7, 10 y 16 están positivamente correlacionados con la degradación de las caseínas, el rendimiento del queso y el tiempo de corte de la cuajada. Los lotes 13 y 15 están negativamente correlacionados con parámetros tales como el rendimiento del queso, la degradación de α , β y κ -caseínas y el tiempo de cuajado. La misma tendencia se observa para los lotes 9 y 11, pero en menor medida. Por tanto, las plantas de cardo que presentaron alta actividad proteolítica *in vitro*, también mostraron esa actividad en los quesos. Por tanto, es evidente que las plantas de cardo utilizadas como cuajo influirán de forma diferente en el desarrollo de las características sensoriales de los quesos.

Considerando la evolución de los parámetros relacionados con las proteínas a lo largo de la maduración, se observó que las proteínas del lactosuero aumentaron de 171 a 262 mg/g hasta la mitad de la maduración, permaneciendo constantes hasta el final de la maduración. Sin embargo, las caseínas disminuyeron gradualmente durante la maduración, desde 284 a 226 mg/g, debido a la proteólisis, mediada primeramente por el cuajo, y después por los microorganismos presentes en el proceso (Pintado y col., 2010; Pereira y col., 2010). Las proteínas del lactosuero aumentaron debido a la rotura de las caseínas, lo que generó péptidos solubles extraídos con las proteínas del lactosuero. Similarmente, la cantidad de NPN en el queso aumentó durante la maduración de 2,05 a 3,55 mg N/g, y la cantidad de NA, de 0,59 a 1,63 mg N/g. Los índices de proteólisis, IP e IGA, también mostraron mayores valores durante el proceso, demostrando el efecto de la proteólisis durante todo el proceso. Este efecto parece ser más intenso en la segunda parte de la maduración, indicando la posible influencia de los microorganismos en esta actividad. Resultados similares obtuvieron diferentes autores (Núñez y col. 1991; Macedo y Malcata, 1997; Vioque y col., 2000) en quesos tradicionales elaborados con cuajo vegetal. Mas Mayoral y col. (1991) registraron un incremento en IP (NPN/NT) de 3,94 % a los 3 días tras la elaboración, a 13 % al final

del proceso de maduración para el queso “Torta del Casar”. Sanjuán y col. (2002) encontraron en queso “Los Pedroches”, elaborado con cuajo vegetal (*C. cardunculus*) que los valores de NT oscilaron de 5,92 g/100 g a los 2 días de maduración, a 6,04 g/100 g (materia seca) a los 60 días de maduración, además el contenido de NPN y AN en este queso aumentó a lo largo de la maduración. Resultados similares se obtuvieron para el queso de La Serena tras 60 días de maduración (Núñez y col., 1991). Los componentes de N solubles al principio del proceso del queso son producidos fundamentalmente por la acción de las proteasas de *Cynara cardunculus* (Roa y col., 1999; Galán y col., 2012), aunque los microorganismos son responsables de la proteólisis desde la mitad al final del proceso de maduración. La degradación de nitrógeno insoluble en agua, y por tanto la producción de nitrógeno soluble en agua, es principalmente llevada a cabo por el cuajo residual que queda atrapado en la matriz del queso, el cual hidroliza α -caseína (Creamer y Olson, 1982; Dulley, 1974).

Se correlacionaron los parámetros de las características tecnológicas de los cuajos con los parámetros relativos a la proteólisis del queso y se observó por una parte, que el contenido de proteína tras 2 días de maduración, estaba positivamente correlacionado con la actividad coagulante del cuajo (1 h de maceración), de modo que a mayor contenido en proteínas, mayor actividad coagulante (1 h). Entre los factores que afectan a la coagulación de la leche, la concentración de caseínas juega un importante papel (St-Gelais y Haché, 2005). Caron y col. (1997) observaron que la coagulación se retrasaba (mayor tiempo de coagulación) en la leche con alto contenido de proteína relativo a leche con baja concentración de proteína. Además, el contenido de caseínas estaba negativamente correlacionado con la actividad coagulante (24 h de maceración), a los 30 y 60 días de maduración, por tanto a mayor actividad coagulante del extracto preparado tras 24 h de maceración, menor contenido de caseínas a los 30 y 60 días, lo cual se debe a la gran degradación de las caseínas. Van Hekken y Holsinger (2000) observaron que las propiedades de coagulación del cuajo no estaban relacionadas solo con la concentración de caseínas, sino también con la proporción de α -caseína y β -caseína, presentes en la leche. Paralelamente a la evolución de las caseínas, la actividad coagulante del cuajo (24 h de maceración) influyó en el contenido de NA del queso a los 30 y 60 días de maduración, con una correlación positiva, lo que significa que a mayor valor de actividad coagulante (24 h), mayor contenido de NA en el queso, a los 30 y 60 días de maduración, debido al efecto de la degradación de caseínas.

Aunque la proteólisis y la evolución de las propiedades viscoelásticas son procesos intrínsecos en la maduración del queso, parecen ser relativamente insensibles a las variaciones en la starting wild microflora. La evolución del índice de maduración (WSN/TN) explica la liberación de péptidos grandes y solubles en agua directamente a partir de las caseínas. Este fenómeno es causado principalmente por el cuajo residual retenido en la cuajada tras la elaboración, por tanto las bacterias no son relevantes en este evento. La liberación de péptidos de medio y pequeño tamaño es el resultado de la acción combinada del cuajo y las enzimas microbianas a partir de los anteriormente mencionados péptidos grandes, previamente liberados por las enzimas del cuajo. Las enzimas de las bacterias son actores relevantes durante las dos últimas fases de la proteólisis (liberación de péptidos de bajo peso molecular y amino ácidos libres). Sin embargo, la apariencia relativamente lenta de aminoácidos libres puede también ser debida a su considerable captación como fuente de nitrógeno, durante la fase de crecimiento exponencial de las bacterias viables (Pereira y col., 2010). Como se esperaba, las diferentes fracciones de nitrógeno soluble aumentaron con el tiempo de maduración, aunque la carga inicial contaminante no influyó en esos parámetros (Pereira y col., 2010).

Los cambios en la flexibilidad y debilidad final de la estructura de las caseínas son el resultado de la proteólisis (Pereira y col., 2010). Una transición gradual de una red inicial dominada por las proteínas del suero desnaturalizadas ligadas a la superficie de las micelas, a una red dominada por interacciones caseína – caseína a menor pH (Haque y col., 2001), como resultado del metabolismo de LAB, probablemente explica nuestras observaciones. Además, la ruptura del citrato por LAB conlleva a la producción de CO₂, lo que puede también influir en la textura de ciertos productos fermentados (Fox y col., 1993).

El conjunto de reacciones normalmente denominadas como proteólisis secundaria resultan de la acción del cuajo residual y las proteinasas autóctonas de la leche, además de la microflora adventicia (Tavaira y col., 2003). Tendencias similares han sido descritas por Vioque y col. (2000) en queso de leche de oveja coagulada con *C. cardunculus* y por Macedo y Malcata (1997) para el queso Serra da Estrela.

Tavaira y col. (2003) y otros autores que han estudiado los cuajos vegetales (Macedo y Malcata, 1997; Fernández-Salguero y col., 1999) refuerzan la afirmación que

la fuerte acción proteolítica de *C. cardunculus* aumenta considerablemente el inventario de sustratos fermentables, que contienen nitrógeno, en estos quesos. Esta evidencia sugiere que las proteasas del cuajo vegetal poseen baja actividad peptidasa, de acuerdo con Sousa y Malcata (1997) y Reis y col. (2000), que refuerzan la hipótesis de que las peptidasas sintetizadas por los microorganismos adventicios, son las únicas presentes en estos quesos, y por tanto, los principales vectores de la liberación de FAA (Tavaira y col., 2003).

Se utilizaron las técnicas UREA y SDS-PAGE para observar el efecto de la proteólisis durante el proceso de maduración. Trujillo y col. (2000) y Pino y col. (2009) utilizaron estas técnicas para estudiar la actividad proteolítica de diferentes cuajos vegetales, sobre caseína ovina. El perfil de caseínas evolucionó a lo largo de la maduración, mostrando una degradación gradual de las caseínas en todas las muestras (86 % para α -caseína y 74 % para β -caseína). Esto produce una disminución en la concentración de éstas, así como un incremento de los compuestos nitrogenados derivados de las proteínas. Lo mismo ocurrió con las proteínas del lactosuero, con una disminución a lo largo del proceso, pero aparecieron los péptidos derivados de la hidrólisis de las caseínas a lo largo de la maduración. La proteólisis, el ratio de β - a κ -caseínas, ha sido considerada una base para la clasificación de los quesos (Fox, 1993; Sousa, 2001).

Macedo y Malcata (1996) estudiaron la hidrólisis de α_s - y β -caseínas durante la maduración del queso Serra mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en diferentes momentos de la maduración y observaron que a los 35 días de maduración, α_s - y β -caseínas sufrieron una fuerte degradación, hasta 82 y 76 % respectivamente. Sin embargo, otros autores encontraron que α -caseína disminuyó con la maduración, mientras que β -caseína mostró una ligera reducción, confirmando una mayor resistencia a la hidrólisis de β -caseína por parte de la enzima (Fernández –Salguero y Sanjuán, 1999). La inusual hidrólisis de β -caseína (la degradación de α_s - y β -caseínas ocurre con similar intensidad en el queso Serra) parece estar relacionada con el tipo de cuajo (Macedo y Malcata, 1996). La degradación de α -caseína está mucho más influenciada por la actividad coagulante del cuajo empleado, de modo que a mayor actividad coagulante, mayor hidrólisis de estas caseínas (Irigoyen y col., 2000). Marcos y col.

(1979) afirmaron que, en general, α_{s1} -caseína fue degradada con mayor intensidad que β -caseína.

El significativo ratio de degradación de α_s -caseínas solo tras 7 días puede indicar que la microflora juega un importante papel en la hidrólisis de esta proteína, especialmente si se asume que las enzimas de *C. cardunculus* no hidroliza α_s -caseínas tan rápidamente como β -caseínas y que la microflora del queso Serra está formada mayoritariamente por LAB mesofílicas y Coliformes, el número de los cuales alcanza 10^6 ufc/g de queso solo tras 7 días (Macedo y col., 1995; 1996).

Con respecto al contenido de aminas biógenas en queso, no se encontró influencia por parte del cuajo empleado en la elaboración del queso. Los niveles de aminas fueron inferiores comparados con los encontrados en este tipo de productos (Contreras y col., 2007). Por tanto, estos resultados muestran un importante desarrollo de la proteólisis en los quesos durante la maduración, resultando en la generación de NA a una mayor actividad coagulante del cuajo, lo cual no implica un aumento de la producción de aminas biógenas. La producción de aminas biógenas ha sido relacionada con la actividad microbiana del queso, de forma que durante la maduración del queso, la microflora hidroliza las cadenas polipeptídicas liberando aminoácidos, sustrato de las enzimas descarboxilasas microbianas para la producción de aminas biógenas (Silla, 1996). Las Enterobacterias y LAB (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*) son bacterias que poseen enzimas descarboxilasas de los aminoácidos, y por tanto son potencialmente productoras de aminas biógenas (Fernández y col., 1999; Moret y col., 1992; Novella y col., 2000; Vale y col., 1998; Vasundhara y col., 1999).

Respecto a la correlación entre los parámetros de análisis sensorial del queso al final del periodo de maduración con las características del cuajo, se observa que la degradación de β -caseína estaba positivamente correlacionada con la pasta cerrada del queso, mientras que la degradación de esta caseína está negativamente correlacionada con el gusto ácido del queso. La degradación de β -caseína parece influir en la cremosidad del queso, con una correlación negativa, de forma que a mayor degradación, menor cremosidad. Algunos autores sugieren que β -caseína podría ser esencial para la dureza de la cuajada (St. Gelais y col., 2005). De la misma manera la degradación de β -caseína está negativamente correlacionada con el gusto amargo del queso, es decir, a menor degradación, mayor amargor.

El amargor en el queso es más frecuentemente debido a péptidos hidrofóbicos y es generalmente considerado un defecto, aunque notas amargas pueden contribuir a un deseable flavor en el queso maduro. Los péptidos amargos se forman principalmente por la acción del cuajo y las proteinasas del starter y el amargor ocurre en quesos cuando estos péptidos se acumulan en excesiva concentración, ya sea como resultado de sobre producción, o de una inadecuada degradación por enzimas microbianas. Ciertas secuencias en las caseínas son particularmente hidrofóbicas y, cuando se escinden por proteinasas, pueden dar lugar a amargor. Los péptidos amargos de α_{s1} -caseína están predominantemente en la región de los residuos 14-34, 91-101 y 143-151, mientras que los péptidos amargos de β -caseína están en los residuos 46-90, y particularmente en el hidrofóbico C-terminus. La quimosina es importante en la producción de péptidos amargos, dado que el cuajo residual es la principal proteinasa en muchas variedades de queso, y su primera acción sobre β -caseína libera péptidos extremadamente hidrofóbicos. Un bajo ratio de actividad coagulante respecto actividad proteolítica resulta en péptidos amargos en queso maduro (Sousa, 2001).

Por otra parte, la degradación de κ -caseína estaría correlacionada negativamente con la persistencia encontrada en el queso, de forma que una menor degradación de κ -caseína aumenta la persistencia en el queso.

La actividad coagulante (24 h) influye en la cremosidad, la viscosidad y el tipo de queso y aceptabilidad del queso, con una correlación positiva en todos los casos, esto es que parece que a mayor valor de actividad coagulante, mayor valor de cremosidad, viscosidad, y favorece el tipo de queso “Torta” y una mayor aceptabilidad.

La mayor actividad proteolítica en la ruptura de las caseínas y los productos primeramente degradados en los quesos con cuajo vegetal de *C. cardunculus* dieron lugar a una textura más blanda y cremosa (Galán y col., 2008; Agboola y col., 2009).

Por tanto, los cuajos más apropiados para la elaboración de estos quesos, son aquellos que presentan una alta actividad coagulante y una moderada actividad proteolítica sobre β -caseína principalmente, sugiriendo que las plantas de cardo agrupadas en el cluster 1 proporcionarían características deseables en el queso. Un alto ratio de actividad coagulante sobre actividad proteolítica es una herramienta esencial para la clasificación de los cardos usados en el procesado de “Torta del Casar”.

De estos resultados se deduce que las características tecnológicas del cuajo vegetal influyen en el producto final “Torta del Casar”, siendo la actividad coagulante y proteolítica del cuajo, los parámetros fundamentales que determinan las características finales. De modo que el uso de plantas de cardo (*C. cardunculus*) controladas y caracterizadas en la elaboración de “Torta del Casar” es fundamental para obtener un producto homogéneo demandado por la Denominación de Origen Protegida “Torta del Casar”.

V.3.3. Influencia de los microorganismos en las características de la textura del queso “Torta del Casar”

En primer lugar se estudió la procedencia de los microorganismos que aparecen en el queso. Se observó que los mayores recuentos de enterobacterias y coliformes se encontraron en los cuajos, mientras que la leche suministra los mayores recuentos de bacterias ácido-lácticas, lactococos, enterococos, staphylococos, micrococos y mohos y levaduras al queso. Las correlaciones de los recuentos de los quesos a los 2 días de maduración con los recuentos de la leche y el cuajo usados en la elaboración de los lotes de quesos revelaron que la población de bacterias ácido-lácticas en el queso a los 2 días de maduración procede principalmente de la leche, mientras que las poblaciones de psicrotrofos y enterococos proviene de los cuajos. Esto indica que sería importante monitorizar e identificar los microorganismos que proceden de las materias primas y específicamente de los cuajos, los cuales no han sido estudiados, ya que pueden ejercer gran influencia en el producto final, así como en la salud del consumidor. Por otra parte, se espera que la contaminación microbiológica de la leche ejerza influencia sobre las características finales del queso (Pintado y col., 2010). La microbiota de la leche cruda es un componente esencial de muchas variedades de quesos tradicionales y juega importantes funciones durante la elaboración y la maduración del queso (Beresford y col., 2001). Por tanto, las bacterias ácido-lácticas (LAB) y otra flora indígena parecen desarrollar una función relevante en la elaboración del queso y en la generación del distintivo flavor de los quesos (Buchin y col., 1998; Leroy y DeVuyst, 2004; Abriouel y col., 2008).

En cuanto a la evolución de los recuentos de los microorganismos durante la maduración del queso, las poblaciones de coliformes y enterobacterias incrementaron levemente desde el inicio a los 30 días de maduración, y disminuyeron modestamente hasta el final de la maduración. Las bacterias aerobias mesófilas aumentaron levemente mientras que los psicrotrofos permanecieron en torno a 9,2 log ufc/g a lo largo de la maduración. Los lactobacilos aumentaron entre el principio y la mitad, para permanecer constantes hasta los 60 días de maduración, mientras que los lactococos disminuyeron levemente hasta el final de la maduración. La población de enterococos aumentó al inicio del proceso y los staphylococos y micrococos permanecieron más o menos constantes a lo largo de la maduración del queso. Finalmente mohos y levaduras disminuyeron moderadamente desde el inicio al final de la maduración. Algunos autores han obtenido resultados similares en diferentes grupos microbianos que se desarrollan en el queso (Tavaira y col., 1998; Galán y col., 2012).

Dentro del grupo LAB, enterococos es el género más controvertido, porque su hábitat natural es el tracto intestinal de los mamíferos y su presencia en alimentos ha sido usualmente relacionada con pobres condiciones higiénicas durante la elaboración (López – Díaz y col., 1995). Sin embargo, en los últimos años, algunos estudios sobre la microflora de muchos quesos tradicionales de países mediterráneos indican que este grupo puede jugar un papel importante en la maduración de estos quesos, probablemente a través de la proteólisis y lipólisis, contribuyendo así a sus típicas características sensoriales (Foulquié Moreno y col., 2006).

Se correlacionaron los parámetros de proteólisis con los recuentos microbianos de diferentes días a lo largo de la maduración. Al inicio del proceso (2 días) no se observaron correlaciones, lo cual indica que el efecto de los microorganismos en la proteólisis primaria es bajo, como se mencionaba anteriormente. La proteólisis a este nivel estaría relacionada con el cuajo. No obstante, según avanza el proceso de maduración, el efecto de los microorganismos en estos parámetros fue más evidente. Se observó que el grupo de enterococos estaba positivamente correlacionado con AN e IGA a los 30 días de maduración, y con NPN e IP, a los 60 días de maduración. Esto sugiere la importancia de este grupo microbiano en la proteólisis desarrollada durante la maduración. Otros grupos microbianos que se correlacionan positivamente con los parámetros de la proteólisis fueron los psicrotrofos, lactobacilos, lactococos y

staphylococos al final del proceso (60 días). De modo que estos son los grupos microbianos que parecen estar más relacionados con la degradación de las proteínas en estos productos. La proteólisis aumenta el nivel de aminoácidos libres y péptidos, que dan lugar a una mejora en la intensidad del flavor y acelera la maduración del queso (Corsetti y col., 1998; Franklin y col., 1963; Lane y col., 1996; Lynch y col., 1996; McSweeney y col., 1993).

En cuanto al análisis de textura a compresión la dureza y la cohesividad disminuyeron gradualmente durante la maduración, mientras que los valores de adhesividad y área F-T 2:3 fueron más altos según avanzó la maduración. La disminución de la dureza y cohesividad del queso indica una mayor proteólisis (Awad y col., 2005) y el incremento de la adhesividad indica la habilidad de las proteínas para interaccionar con el agua (Pastorino y col., 2003), lo cual tiene lugar durante la maduración.

En el análisis de untuosidad a los 60 días, los valores medios de firmeza y trabajo de untar fueron 7100 g y 6750 gs respectivamente. El valor medio de la pegajosidad fue de 4750 g (valor absoluto) mientras que el trabajo de adhesión mostró un valor medio de 484 gs (valor absoluto). Estos datos se correlacionaron con los recuentos microbianos, y se observó que los recuentos a los 2 días tras la elaboración de los quesos no había correlaciones con ningún parámetro de textura, indicando el bajo efecto de los microorganismos al principio del proceso. El cambio temprano en la textura se atribuye a un número de factores como la proteólisis de las caseínas mediada por el cuajo (Lucey y col., 2003). Se puede observar cómo los grupos microbianos que se correlacionaron positivamente con los parámetros de adhesividad fueron psicrotrofos, bacterias ácido lácticas, lactococos y enterococos, con los recuentos encontrados a los 2, 30 y 60 días. Por el contrario, enterobacterias y coliformes estaban negativamente correlacionados, poniendo de manifiesto el efecto negativo de estos grupos microbianos en la textura de los quesos. Este grupo también estaba negativamente correlacionado con la dureza y cohesividad a los 60 días, por tanto, un incremento de estos microorganismos produce una gran falta de firmeza (blandeza) al producto.

Resultados similares se encontraron en el análisis sensorial, en el cual los grupos microbianos positivamente correlacionados con la cremosidad y viscosidad del queso fueron psicrotrofos, bacterias ácido-lácticas, lactococos y staphylococos. El grupo de las

bacterias ácido-lácticas y lactococos, con el parámetro de acidez, y estos mismos grupos y enterococos estaban positivamente correlacionados con la intensidad. En todos los casos, los parámetros sensoriales estaban correlacionados con los recuentos encontrados después de los 2 días de maduración. Finalmente, la aceptabilidad global por el tipo de queso “Torta del Casar” estaba correlacionada positivamente con los recuentos de psicrotrofos, bacterias ácido-lácticas, lactococos, enterococos y staphylococos.

En conclusión, los microorganismos han mostrado una influencia decisiva en los parámetros estudiados relativos a la proteólisis y la textura a lo largo del proceso de maduración, enfatizando el papel de las bacterias ácido-lácticas, lactococos y enterococos. Por tanto, para controlar el proceso, sería deseable controlar estos microorganismos, siendo esencial el desarrollo de un cultivo starter adecuado para este producto tradicional.

V.4. Ceder a la DOP “Torta del Casar” el cardo más adecuado para la obtención de las mejores tortas.

Gracias a la realización de este estudio es posible ceder a la DOP “Torta del Casar” no solo los resultados sobre las características que deben presentar los cuajos que se emplean en el proceso de elaboración de la “Torta del Casar” para conseguir mejores quesos, sino también algunos ejemplos de las plantas de *Cynara cardunculus* de las que proceden estos cuajos. Dado que se demuestra la gran variabilidad que existe entre las poblaciones y dentro de las poblaciones de *Cynara cardunculus* de Extremadura, lo que redundaría en cuajos muy heterogéneos en cuanto a sus características tecnológicas. Además se pone a disposición de la DOP “Torta del Casar” una serie de técnicas analíticas, como SDS-PAGE y FZCE, que puede implantarse como herramientas en el control de calidad rutinario, con las que puede garantizarse la autenticidad del cuajo, la trazabilidad del proceso, y conocer las características tecnológicas de los cuajos previamente a su utilización en la elaboración del queso.

Otro de los aspectos que se aborda en este trabajo, y que podrá ser de utilidad para los elaboradores de “Torta del Casar” es la influencia de diferentes parámetros de la preparación de los cuajos a partir de las flores de *Cynara cardunculus*, en la actividad

coagulante del cuajo, una de las características tecnológicas más influyentes en las características del queso.

Conocidas las propiedades tecnológicas de los cuajos, es posible, con los métodos desarrollados en este trabajo, predecir la influencia de los cuajos en las características del queso al final de su proceso de maduración, tanto en lo que se refiere a las características físico – químicas, la textura y las características sensoriales.

Se ha determinado la influencia que ejerce el cuajo en la proteólisis que se produce en el queso a lo largo del proceso de maduración, siendo relevante su influencia en la conocida como primera proteólisis. La microflora presente en el queso, sin embargo, es la responsable de la proteólisis que ocurre en la segunda parte de la maduración del queso, redundando también en las características finales del queso. El origen de estos microorganismos es por un lado la leche cruda que se emplea en el proceso, y por otro, el cuajo, el cual no se somete a ningún proceso para la reducción de su carga microbiana. Este aspecto se recoge en este estudio por primera vez y se reconoce la influencia de los microorganismos que aporta el cuajo en el producto final. Tanto la leche como el cuajo, presentan elevadas cargas microbianas, no solo de microorganismos que favorecen la proteólisis y aportan características de calidad al queso, sino también microorganismos indeseables, que pueden comprometer la calidad del producto final, y suponer un riesgo sanitario.

Por tanto, se sugiere la utilización de cultivos iniciadores para controlar el proceso de maduración del queso, evitando la proliferación de microorganismos indeseables, pero también se considera necesario incluir métodos para reducir la carga microbiana del cuajo, sin influir en sus propiedades tecnológicas.

En base a toda esta información, la DOP “Torta del Casar” está en disposición de seleccionar los mejores cardos de la especie *Cynara cardunculus*, en cuanto a sus características tecnológicas, con el fin de cultivarlo y así tener asegurado el suministro de un cuajo de calidad, de cara a su repercusión en las características del queso, y con el que poder acotar la heterogeneidad del producto final, debida a este ingrediente.

VI. CONCLUSIONES

1. Las diferentes especies de cardo de la familia Asteraceae estudiadas han sido caracterizadas y pueden ser identificadas con cualquiera de las técnicas utilizadas, morfológicamente, por biología molecular, a través de sus perfiles de proteínas, FZCE y SDS-PAGE, y mediante su actividad proteolítica. Con estas técnicas se han analizado plantas individuales de *Cynara cardunculus* de varias poblaciones de Extremadura y se ha encontrado un nivel de variabilidad genética sustancial entre diferentes poblaciones de Extremadura y dentro de poblaciones morfológicamente uniformes. Los perfiles proteicos de las flores de las diferentes especies de cardo, permiten la diferenciación y caracterización de dichas especies. Se ha determinado el perfil típico de cada una de las especies estudiadas, tanto mediante la técnica SDS-PAGE, como con la técnica FZCE. Con la técnica FZCE se ha puesto de manifiesto la variabilidad genética existente entre las poblaciones de *C. cardunculus*.
2. Las técnicas, moleculares y las que determinan el perfil de proteínas de las flores de las diferentes especies, se consideran como una herramienta potencialmente útil para garantizar la autenticidad y la trazabilidad del cardo empleado como cuajo en la elaboración de “Torta del Casar”. El uso de plantas de cardo (*C. cardunculus*) caracterizadas, en base a su actividad coagulante y proteolítica, en la elaboración de “Torta del Casar” es fundamental para obtener un producto homogéneo demandado por la Denominación de Origen Protegida “Torta del Casar”.
3. La actividad coagulante que presenta el extracto de *Cynara cardunculus* es diferente para cada planta. La localización, el estado de maduración de la flor y el año de recolección son factores que no influyen en la actividad coagulante. La actividad coagulante de un extracto varía con la concentración con la que se prepara, así como con la cantidad de extracto que se añade a la leche. El tiempo de maceración del extracto ejerce menos influencia que los factores anteriores. Los extractos pueden mantenerse en refrigeración hasta una semana sin que se reduzca su actividad coagulante.

4. Los factores año de recolección, localización y estado de maduración de la flor son ineficaces como criterio para seleccionar las flores de *Cynara cardunculus* que son apropiadas tecnológicamente para la producción de cuajo vegetal en la elaboración de “Torta del Casar”. Se proponen modelos de predicción basados en las características tecnológicas de los cuajos, de forma que se pueda conocer previamente a la elaboración del queso, las características sensoriales que puede aportar al producto final, dentro del margen de acción o influencia del cuajo en las características del producto final.
5. Las diferencias en las actividades coagulante y proteolítica de los cuajos tienen un importante impacto en los parámetros físico-químicos de los quesos en la fase inicial, así como en la textura y el análisis sensorial en el producto final. La actividad coagulante tras 24 h de maceración y la intensidad de degradación de β -caseína han sido relacionadas con la cremosidad. La capacidad de degradación de las caseínas de los extractos condiciona los parámetros de untuosidad, como la firmeza y el trabajo de untar. Se emplea el método de regresión parcial de mínimos cuadrados (PLSR) para predecir la textura del queso a partir de la degradación de las caseínas del cuajo, el cual ($r = 0,688$) indica que las características tecnológicas del cuajo influyen en un 47,4 % sobre el parámetro de textura “trabajo de untar” del queso.
6. Las características tecnológicas del cuajo vegetal influyen en el producto final “Torta del Casar”, siendo la actividad coagulante y proteolítica del cuajo, los parámetros fundamentales que determinan las características finales del queso. Los cuajos más apropiados para la elaboración de estos quesos, son aquellos que presentan una alta actividad coagulante y una moderada actividad proteolítica sobre β -caseína principalmente. Un alto ratio de actividad coagulante sobre actividad proteolítica es una herramienta esencial para la clasificación de los cardos usados en el procesado de “Torta del Casar”.
7. Los microorganismos han mostrado una influencia decisiva en los parámetros estudiados relativos a la proteólisis y la textura a lo largo del proceso de maduración, enfatizando el papel de las bacterias ácido lácticas, lactococos y enterococos. Por tanto, para controlar el proceso, sería deseable controlar estos

microorganismos, siendo esencial el desarrollo de un cultivo starter adecuado para este producto tradicional.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abriouel, H., Martín-Platero, A., Maqueda, M., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M. (2008). *Biodiversity of the microbial community in a Spanish farmhouse cheese as revealed by cultura-dependent and culture-independent methods*. International Journal of Food Microbiology, 127, 200-208.
- Adda, J., Gripon, J. C., y Vasaal, L. (1982). *The chemistry of flavour and texture generation in cheese*. Food Chemistry, 9, 115-129.
- Agboola, S. O., Chan, H. H., Zhao, J., Rehman, A. (2009). *Can the use of Australian cardoon (Cynara cardunculus, L.) coagulant overcome the quality problems associated with cheese made from ultrafiltered milk?*. LWT – Food Science and Technology, 42, 1352-1359.
- Almeida, G., Figueredo, A., Rôla, M., Barros, R., Gibbs, P., Hogg, T., Teixeira, P. (2007). *Microbiological characterization of randomly selected Portuguese raw milk cheeses with reference to food safety*. J. Food Prot., 70, 1710-1716.
- Antila, P., Antila, V., Mattila, J., y Hakkarainen, H. (1984). *Biogenic amines in cheese. II. Factors influencing the formation of biogenic amines, with particular reference to the quality of the milk used in cheese making*. Milchwissenschaft, 39, 400-404.
- AOAC (2005). *Official Methods of Analysis, nineteenth ed. Association of Official Analytical Chemists*. Washington, DC, USA.
- APHA, (1976). *Recommended Methods for the microbiological examinations of foods*. American Public Health Association. Washington. USA.
- APHA, (1985). *Standard methods for the examination of dairy products*. 15th ed. American Public Health Association. Washington. USA.
- Ariza-Espinar, L., Delucchi, G. (1998). 280 Asteraceae, parte II. Tribu XL. Cardueae. In L. Ariza-Espinar (Ed.), *Flora Fanerogámica Argentina* (pp.24-25). Córdoba: Pro Flora.
- Awad, S., Hassan, A. N. y Muthukumarappan, K. (2005). *Application of Exopolysaccharide-Producing cultures in reduced-fat cheddar cheese: texture and melting properties*. Journal of Dairy Science, 88: 4204-4213.

Bibliografía

- Banks, W (1991). *Milk fat production*. In K. K. Rajah, & K. J. Burgess (Eds.), Milk fat: production, technology and utilization (pp. 1-8). Cambridgeshire: Society of Dairy Technology.
- Barbosa, M., Vassal, L., Valles, E., y Mocquot, G. (1976). *L'utilisation d'extrait de Cynara cardunculus L comme agent coagulant en fabrication de fromages á pate cuite*. Le Lait, 54, 1-17.
- Barbosa, M. (1983). "Cardo" (*Cynara cardunculus, L*) as vegetable rennet. Boletim do Departamento de Tecnologia e Indústria Alimentar, 58 (45), 1-11.
- Barrón, L. J. R., Redondo, Y., Aramburu, M., Gil, P., Pérez-Elortondo, F. J., Albisu, M., (2007). *Volatile composition and sensory properties of industrially produced Idiazabal cheese*. International Dairy Journal, 17, 1401-1414.
- Barros, R.M. y Malcata, F.X. (2004). *A kinetic model for hydrolysis of whey proteins by cardosin A extracted from Cynara cardunculus*. Food Chemistry, 88, 351-359.
- Barros, R. M. y Malcata, F. X. (2006). *Molecular characterization of peptides released from β -Lactoglobulin and α -Lactoalbumin via Cardosins A and B*. Journal Dairy of Science, 89, 483-494.
- Battistotti, C. y Corradini, C. (1993). *Italian cheese*, In, Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 2, 2nd edn, P.F. Fox, ed. Chapman & Hall, London. pp. 221-243.
- Bautista, F. M., Bravo, M. C., Campelo, J. M., García, A., Luna, D., Marinas, J. M. y Romero, A. A. (1999). *Covalent immobilization of porcine pancreatic lipase on amorphous AlPO₄ and other inorganic supports*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 72, 249-254.
- Bean, S. R. y Lookhart, G. L. (2001). *Recent developments in high performance capillary electrophoresis of cereal proteins*. Electrophoresis, 22, 1503-1509.
- Beckmann, J.S. y Soller, M. (1986). *Restriction fragment length polymorfism in plant genetic improvement*. En: Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology. Mifflin, B.J. 3, 197-250.

- Benito, M.J., Rodríguez, M., Córdoba, M.G. y Andrade, M.J. (2005). *Effect of the fungal protease EPg222 on proteolysis and texture in the dry fermented sausage "salchichón"*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 85, 273-280.
- Benito, M.J., Martín, A., Aranda, E., Pérez-Nevado, F., Ruiz-Moyano, S., y Córdoba, M.G. (2007). *Characterization and selection of autochthonous lactic acid bacteria isolated from traditional Iberian dry-fermented Salchichón and Chorizo sausages*. Journal of Food Science, 72, 193-201.
- Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L., Cogan, T.M. (2001). *Recent advantages in cheese microbiology*. International Dairy Journal, 11, 259-274.
- Beyer, B. M., Dunn B. M. (1998). *Prime region subsite specificity characterization of human cathepsin D: the dominant role of position 128*. Protein Science 7, 88-95.
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959). *A rapid method of total lipid extraction and purification*. Canadian Journal Biochemistry, 42, 371-386.
- Bietz, J. A. (1994). *Fractionation of wheat gluten proteins by capillary electrophoresis*. In Gluten Proteins; Association of Cereal Research: Detmold, Germany, pp 404 - 413.
- Bradford, M. M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry, 72, 248-254.
- Bringe, N.A., Kinsella, J.E., (1986). *Influence of calcium chloride on the chymosin-initiated coagulation of casein micelles*. J. Dairy Research 53, 371-379.
- Brodelius, P.E., Cordeiro, M.C. & Pais, M.S. (1995). *Aspartic proteinases (cyprosins) from Cynara cardunuculus spp. flavescentis cv. cardoon; purification, characterisation, and tissue-specific expression*. Advances in Experimental Medicine and Biology, 362, 255 – 266.
- Broun, P. y Tanksley, S.D. (1996). *Characterisation and genetic mapping of simple sequences in the tomato genome*. Molecular and General Genetics. 250, 39-49.
- Cáceres, P., Castillo, D., Pizarro, M. (1997). *Secondary flora of Casar de Cáceres cheese: Characterization of Micrococcaceae*. International Dairy Journal, 7, 531-536.

Bibliografía

- Camacho, R. C., Guerra, R., Aguilar M. and Oro Ventura, L. (1990). *Chemical characterization of proteases extracted from wild thistle (Cynara cardunculus, L.)*. Food Chemistry, 35, 89-97.
- Campos, R., Guerra, R., Aguiar, M., Ventura, O., y Camacho L. (1990). *Chemical characterization of proteases extracted from wild thistle (Cynara cardunculus)*. Food Chem. 35, 89-97.
- Cancalon, P. F. (1995). *Capillary electrophoresis: a useful technique for food analysis*. Food Technology, 49, 52-58.
- Cattaneo, T. M. P., Nigro, F., Toppino, P. M., y Denti, V. (1996). *Characterization of ewe's milk by capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A, 721, 345-349.
- Carbonell, M., Núñez, M., Fernández-García, E. (2002a). *Evolution of the volatile components of ewe raw milk La Serena cheese during ripening. Correlation with flavor characteristics*. Le Lait, 82, 683-698.
- Carbonell, M., Núñez, M., Fernández-García, E. (2002b). *Seasonal variation of volatile compounds in ewe raw milk La Serena cheese*. Le Lait, 82, 699-711.
- Caron, A., St-Gelais, D., & Pouliot, Y. (1997). *Coagulation of milk enriched with ultrafiltrated or diafiltered milk retentate powders*. International Dairy Journal, 7 (6-7), 445-451.
- Cavalli, S. V., Claver, S., Priolo, N., y Natalucci, C. (2005). *Extraction and partial characterization of a coagulant preparation from Silybum marianum flowers. Its action on bovine caseinate*. Journal of Dairy Research, 72, 271-275.
- Cavalli, S. V., Silva, S., Cimino, C., Malcata, F. X., y Priolo, N. (2008). *Hydrolysis of caprine and ovine milk proteins, brought about by aspartic proteases from Silybum marianum flowers*. Food Chemistry 106, 997-1003.
- Celano, G. V., Cafarchia, C., Buja, F., Tiecco, G. (1992). *Biogenic amines determination in cheese*. Industrie Alimentari, 31, 764-768.
- Chang, S.; Ayres, J.; Sandine, W. (1985). *Analysis of cheese for histamine, tyramine, tryptamine, histidine, tyrosine and tryptophane*. Journal of Dairy Science, 68 (11), 2840 – 2846.

- Chamorro M.C. y Losada M.M. (2002). En: *El análisis sensorial de los quesos* Eds.: AMV. and Mundi- Prensa, Madrid. pp. 46.
- Chávarri, F., Bustamante, M. A., Santisteban, A., Virto, M., Barron, L. J. R. y de Renobales, M. (1999). *Changes in the free fatty acids during ripening of Idiazabal cheese manufactured at different times of the year*. Journal Dairy Science, 82, 885-890.
- Chich, J. F., Marchesseau, K., & Gripon, J. C. (1997). *Intracellular esterase from Lactococcus lactis subsp. Lactis NCDO 763: Purification and characterization*. International Dairy Journal, 7, 169-174.
- Chitipinityol, S., Crabbe, M.J.C., (1998). *Chymosin and aspartic proteinasas*. Food Chemistry, 61, 395-418.
- Chow, R. B., Kassell, B. (1968). *Bovine pepsinogen and pepsin I. Isolation, purification and some properties of pepsinogen*. J. Biol Chem 243, 1718-1724.
- Christen, C. y Virasoro, E. (1935). *Présures végétales. Extraction et propriétés (fin)*. Le Lait – Mémoires Originiaux 496-505.
- Coda, R., Breachany, E., De Angelis, M., De Candia, S., Di Cagno, R., Gobbetti, M. (2006). *Comparison of the compositional, microbiological, biochemical and volatile profile characteristics of nine Italian ewe's milk cheeses*. Journal of Dairy Science, 89, 4126-4143.
- Collomb, M., Butikofer, U., Spahni, M., Jeangreos, B., y Bosset, J. O. (1999). *Composition en acides gras et en glycérides de la matière grasse du lait de vache en zone de montagne et de plaine*. Science Alimentaria, 19, 97-104.
- Contreras, M., Izquierdo, P., Allara, M., García, A., Torres, G., Céspedes, E. (2007). *Biogenic Amines Determination in Ripened Cheeses*. Revista Científica, FCV-LUZ, Vol. XVII, 1, 89-95.
- Cordeiro, M.C., Jakob, E., Puhán, Z., Pais, M.S. y Brodelius, P.E. (1992). *Milk clotting and proteolytic activities of purified cynarases from Cynara cardunculus – a comparison to chymosin*. Milchwissenschaft 47, 683-700.
- Cordeiro, M.C., Xue, Z.T., Pietrzak, M., Pais, M.S. y Brodelius, P.E. (1994). *Isolation and characterization of an cDNA from flowers of Cynara cardunculus encoding*

Bibliografía

- cyprosin (an aspartic proteinase) and its use to study the organ-specific expression of cyprosin*. *Plant Molecular Biology*, 24, 733-741.
- Córdoba, J.J. (1990). *Transformaciones de los componentes nitrogenados durante la maduración del jamón de cerdo ibérico*. Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura.
- Corsetti, A., Gobetti, M., Smacchi, E., De Angelis, M., Rossi, J. (1998). *Accelerated ripening of Pecorino Umbro cheese*. *Journal of Dairy Research*, 65, 631-642.
- Creamer, L. K., y Olson, N. F. (1982). *Rehological evaluation of maturing Cheddar cheese*. *Journal of Food Science*, 47, 631-636.
- Curioni, P. M., Bosset, J. O. (2002). *Key odorants in various cheese type as determined by gas chromatography-olfactometry*. *International Dairy Journal*, 12, 959-984.
- Dalgleish, D. E. (1987). *The enzymatic coagulation of milk*. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1. (Ed. P. F. Fox). Elsevier Applied Science Publishers, London, pp. 63-96.
- Dalgleish, D. G. (1992). *The enzymatic cogulation of milk*. In P. F. Fox (Ed.), *Advanced dairy chemistry. Proteins* (Vol. 1, pp.579-619). London: Elsevier.
- Deeth, H. C. y Touch, V. (2000). *Methods for detecting lipase activity in milk and milk products*. *Australian Journal of Dairy Technology*, 55, 153-168.
- Delgado, F. J., González-Crespo, J. Cava, R., García-Parra, J., Ramírez, R. (2010). *Characterisation by SPME-GC-MS of the volatile profile of a Spanish soft cheese P.D.O. Torta del Casar during ripening*. *Food Chemistry* 118, 182-189.
- De Ketelaere, A., Demeyer, D., Vandekerckhove, P. y Vervaeke, I. (1974). *Stoichiometry of carbohydrate fermentation during dry sausage ripening*. *Journal of Food Science*, 39, 297-300.
- Desmazeaud, M. J., y Gripon, J. C. (1977). *General mechanism of protein breakdown during cheese ripening*. *Milchwissenschaft*, 32, 731-734.
- Dingle, J. T., Leaback, D. H. (1975). *Secretion of enzymes into pericellular environment*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 271, 315-324.

- do Amaral Franco, J. (1976). *Cynara* L. In T.G. Tutin, V. H. Heywood, N. A. Burges, D. M. Moore, D. H. Valentine, & S. M. Walters, et al. (Eds.). *Flora Europea* (Vol. 4). Cambridge: Cambridge University Press.
- Duarte, P., Figueiredo, R., Pereira, S. y Pissarra, J. (2006). *Structural characterization of the stigma – style complex of Cynara cardunculus (Asteraceae) and immunolocalization of cardosins A and B during floral development*. *Can. J. Bot.* 84: 737-749.
- Dulley, J. R. (1974). The contribution of rennet and starter enzymes to proteolysis in cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, (June), 65-69.
- Egas, C., Lavoura, N., Resende, R., Brito, R. M., Pires, E., de Lima, M. C., Faro, C. (2000). *The saposin-like domain of the plant aspartic proteinase precursor is a potent inducer of vesicle leakage*. *J. Biol Chem* 275, 38190-38196.
- Egito, A. S., Girardet, J. M., Laguna, L. E., Poirson, C., Mollé, D., Miclo, L., Humbert, G., y Gaillard, J. L. (2007). *Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and hydrolysis of bovine κ -casein*. *International Dairy Journal*, 17, 816-825.
- El-Ansari, M.A.I., El-Negoumy, S.I., Saleh, N.A.M. (1988). *The flavonoids of Cynara sibthorpiana*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 16, 285.
- El-Negoumy, S.I., El-Sayed, N.H., Saleh, N.A.M. (1987). *Flavonoids glycosides of Cynara scolymus*. *Fitoterapia*, 3, 178-180.
- Enne, G., Elez, D., Fondrini, F., Bonizzi, I., Feligini, M., Aleandri, R. (2005). *High-performance liquid chromatography of governing liquid to detect illegal bovine milk's addition in water buffalo Mozzarella: Comparison with results from raw milk from raw milk and cheese matrix*. *Journal of Chromatography A*, 1094, 169-174.
- Esteves, C.L.C., Lucey, J.A., Pires, E.M.V. (2001). *Mathematical modeling of the formation of rennet – induced gels by plant coagulants and chymosin*. *Journal of Dairy Research* 68, 499-510.
- Esteves, C.L.C., Lucey, J.A., y Pires, E.M.V. (2002). *Rheological properties of milk gels made with coagulants of plant origin and chymosin*. *International Dairy Journal* 12, 427-434.

Bibliografía

- Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C. (2008). *Phenolic composition of Cynara cardunculus L. Organs, and their biological activities*. C. R. Biologies 33, 372-379.
- Faro, C.J. (1991). *Purification and physico-chemical characterization of Cynara cardunculus L. protease*. Ph.D. Dissertation, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal.
- Faro, C.C., Moir, A.J., y Pires E.V. (1992). *Specificity of a milk-clotting enzyme extracted from the thistle Cynara cardunculus L.: Action on oxidized insulin and k-casein*. Biotechnology Letters 14, 841-846.
- Faro, C.J., Veríssimo, P., Lin, Y., Tang, J., y Pires, E.V. (1995). In K. Takahashi (Ed.), *Aspartic proteinases: Structure, Function, Biology and Biomedical Implications* (pp. 373-377). New York, USA: Plenum Press.
- Faro, C., Ramalho – Santos, M., Veríssimo, P., Pissarra, J., Frazão, C., Costa, J., Lin, X., Tang, J., y Pires, E. (1998). *Structural and functional aspects of cardosins*. Adv. Exp. Med. Biol. 436, 423-433.
- Faro, C. J., Ramalho-Santos, M., Vieira, M., Mendes, A., Simoes, I., Andrade, R., Veríssimo, P., Lin, X. L., Tang, J. y Pires, E. (1999). *Cloning and characterization of cDNA encoding cardosin A, all RGD-containing plant aspartic proteinase*. Journal of Biological Chemistry, 274, 28724-28729.
- Fernández, J., Curt, M. D., y Aguado, P. L. (2006). *Industrial applications of Cynara cardunculus L. for energy and other uses*. Industrial Crops and Products, 24, 222-229.
- Fernández-García, E., Carbonell, M., Núñez, M. (2002a). *Volatile fraction and sensory characteristics of Manchego cheese, 1. Comparison of raw and pasteurized milk cheese*. Journal of Dairy Research, 69, 579-593.
- Fernández-García, E., Carbonell, M., Núñez, M. (2002b). *Volatile fraction and sensory characteristics of Manchego cheese, 2. Seasonal variation*. Journal of Dairy Research, 69, 595-604.

- Fernández-García, E., Gaya, P., Medina, M., Núñez, M. (2004). *Evolution of the volatile components of ewe's raw milk Zamorano cheese: Seasonal variation*. International Dairy Journal, 14, 701-711.
- Fernández-García, E., Carbonell, M., Calzada, J., Núñez, M. (2006). *Seasonal variation of the free fatty acids contents of Spanish ovine milk cheese protected by a designation of origin: A comparative study*. International Dairy Journal, 16, 252-261.
- Fernández-Salguero, J., Sanjuán, E., y Montero, E. (1991). *A preliminary study of the chemical composition of Guía cheese*. Journal of Food Composition and Analysis, 4, 177-183.
- Fernández –Salguero, J., Gómez, R. (1997). *Study of the Traditional Cheese of Andalucía; Universidad de Córdoba-Cajasur: Córdoba, Spain*.
- Fernández-Salguero, J., and Sanjuán, E. (1999). *Influence of vegetable and animal rennet on proteolysis during ripening in ewe's milk cheese*. Food Chem. 64, 177-183.
- Ferreira, I. M. P. L. O., Pinho, O. y Sampaio, P. (2009). *Volatile fraction of DOP "Castelo Branco" cheese: Influence of breed*. Food Chemistry, 112, 1053-1059.
- Figuereido, R., Duarte, P., Pereira, S., Pizarra, J. (2006). *The embryo sac of Cynara cardunculus: ultrastructure of the development and localization of the aspartic proteinase cardosin B*. Sex Plant Repord. 19, 93-101.
- Fleet, G. H. (1999). *Microorganisms in food ecosystems*. Int. J. Food Microbiol. 50, 101-117.
- Foltmann, B. (1992). *Chymosin-a short review on fetal and neonatal gastric proteases*. Scand J Clin Lab Invest 52, 65-79.
- Fontecha, J., Peláez, C. y Juárez, M. (1994). *Biochemical characteristics of a semi-hard ewe's-milk cheese*. Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung, 198, 24-28.

Bibliografía

- Foulquié Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., DeVuyst, L. (2006). *The role and application of enterococci in food and health*. International Journal of Food Microbiology 106, 1-24.
- Fox, P. F. y Walley, B. F. (1971). *Influence of sodium chloride on the proteolysis of casein by rennet and pepsin*. Journal of Dairy Research, 38, 165-170.
- Fox, P.F. (1989). *Proteolysis during cheese manufacture and ripening*. J. Dairy Sci. 72, 1379-1400.
- Fox, P. F., Law, J. (1991). *Enzymology of cheese ripening*. Food Biotechnology, 5, 239-262.
- Fox, P. F., Law, J., McSweeney, P. L. H., & Wallace, J. (1993). *Biochemistry of cheese ripening*. In P. F. Fox (Ed.), *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*, Vol. 1 (pp. 389-438). London: Chapman & Hall.
- Fox, P. F. (1993). *Cheese: An overview*. In: P. F. Fox, *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1 (pp. 1-36). London: Chapman & Hall.
- Fox, P. F., y McSweeney, P. L. H. (1996). *Proteolysis in cheese during ripening*. Food Reviews International, 12, 457-509.
- Fox, P. F. y Wallace, J. M. (1997). *Formation of flavor compounds in cheese*. Advances in Applied Microbiology, 45, 17-85.
- Fox, P. F., McSweeney, P. L. H. y Lynch, C. M. (1998). *Significance of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese*. Australian Journal of Dairy Technology, 53, 83-89.
- Fox, P. F., McSweeney, P. L. H. (1998). *Dairy chemistry and biochemistry*. London: Chapman & Hall.
- Fox, P. F. y Stepaniak, L. (1993). *Enzymes in cheese technology*. International Dairy Journal, 3, 509-530.
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M. y McSweeney, P. L. H. (2000). *Fundamentals of Cheese Science*. Gaithersburg Maryland: Aspen Publishers, Inc.

- Franklin, J. G., Sharpe, M. E. (1963). *The incidence of bacteria in cheesemaking and Cheddar cheese and their association with flavor*. Journal of Dairy Research, 30, 87-99.
- Freitas, A. C., Macedo, A. C. y Malcata, F. X. (2000). *Review: Technological and organoleptic issues pertaining to cheeses with denomination of origin manufactured in the Iberian Peninsula from ovine and caprine milks*. Food Sci. Tech. Int. 6, 351-370.
- Freitas, C. A., y Malcata, F. X. (2000). *Microbiology and biochemistry of cheeses with Appellation d'Origine Protégée and manufactured in the Iberian Peninsula from ovine and caprine milks*. Journal Dairy Science, 83, 584-602.
- Galán, E., Prados, F., Pino, A., Tejada, L., Fernández-Salguero, J. (2008). *Influence of different amounts of vegetable coagulant from cardoon *Cynara cardunculus* and calf rennet on the proteolysis and sensory characteristics of cheese made with sheep milk*. International Dairy Journal, 18, 93-98.
- Galán, E., Cabezas, L., Fernández-Salguero, J. (2012). *Proteolysis, microbiology and sensory properties of ewe's milk cheese produced with plant coagulant from cardoon *Cynara cardunculus*, calf rennet or a mixture thereof*. International Dairy Journal, doi:10.1016/j.idairyj.2012.02.001.
- Gattuso, A. M., Pirrone, L., Seminerio, V. y Arcoleo, G. (1995). *Changes of the compositive parameters in Pecorino cheeses during ripening*. I. Sci. Tech. Latt.-Cas. 46, 167-177.
- Giudici, P., Scilio, G., Romano, D., Russo, C. y Migliorisi, D. (1997). *Effect of technological parameters on microbial counts in Pecorino Siciliano cheese*. Latte 22, 76-84.
- Gominho, J., Fernández, J., Pereira, H. (2001). **Cynara cardunculus* L.- a new fibre crop for pulp and paper production*. Ind. Crops Prod. 13, 1-10.
- González, J., Pérez, F., Fernández, J., Lezaun, J. A., Rodríguez, D., Perea, F., Romero, C., Ochoa, M. J., García, M. (2004). *Study of *Cynara cardunculus* L. lignocellulosic biomass production in dry conditions*. Acta Hortic. 660, 221-227.

- González, J. F., González-García, C. M., Ramiro, A., González, J., Sabio, E., Gañán, J. Rodríguez, A. (2004). *Combustion optimization of biomass residues pellets for domestic heating with a mural boiler*. Biomass Bioenergy 27, 145-154.
- Grancai, D., Nagy, M., Suchý, V. y Ubik, K. (1992). *Constituents of Cynara cardunculus L. I. Sterols and pentacyclic triterpens*. Farmaceutický Obzor, 61, 577-580.
- Grancai, D., Nagy, M., Suchý, V. y Ubik, K. (1993). *Constituents of Cynara cardunculus L. II. Flavonoids*. Farmaceutický Obzor, 62, 31-33.
- Grancai, D., Nagy, M., Suchý, V. y Novomeský, P. (1994). *Cynarin from the fresh flower buds of Cynara cardunculus*. Fitoterapia, 65, 282.
- Grancai, D., Mucaji, P., Nagy, M., y Ubik, K. (1996). *Constituents of Cynara cardunculus L. IV. Flavonoid glycosides*. Farmaceutický Obzor, 65, 255-256.
- Grieve, M. (1971). *A modern herbal*. New York: Dover Publications.
- Gripón, J. C., Monnet, V., Lamberet, G., Desmazeaud, M. J. (1991). *Microbial enzymes in cheese ripening*. In P.F. Fox (Ed.), Food enzymes (pp.131-168). London: Elsevier Applied Science.
- Guillén, M.D., Ibargoitia, M.L., Sopelana, P., Palencia, G., Fresno, N. (2004). *Components detected by means of solid-phase microextraction and gas-chromatography/mass spectrometry in the headspace of artisan fresh goat cheese smoked by traditional methods*. Journal of Dairy Science, 87, 284-299.
- Guinee, T. M. y Wilkinson, M. G. (1992). *Rennet coagulation and coagulants in cheese manufacture*. Journal of the Society of Dairy Technology, 45, 94-104.
- Gunstone, F. D., Harwood, J. L. y Padley, F. B. (1994). *Milk lipids*. In The lipid handbook (2nd ed.) (pp. 195-197). London: Chapman & Hall.
- Gupta, S.K., y Eskin, N.A.M. (1977). *Potential use of vegetable rennet in production of cheese*. Food Technology, 31, 62-64.

- Halasz, A., Barath, A., Simon-Sarkadi, L., Holzhapeel, W. (1994). *Biogenic amines and their production by microorganisms in food*. Trends in Food Science and Technology, 5, 42-46.
- Heimgartner, U., Pietrzak, M., Geertsen, R., Brodelius, P., Silva Figueredo, A.C. y Pais, M.S. (1990). *Purification and partial characterization of milk clotting proteases from flowers of Cynara cardunculus*. Phytochemistry 29, 1405-1410.
- Hernández, A., Martín, A., Aranda, E., Bartolomé, T., Córdoba M.G. (2006). *Detection of smoked paprika “Pimentón de la Vera” adulteration by Free Zone Capillary Electrophoresis (FZCE)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54 (12), 4141-4147.
- Hernández, A., Martín, A., Aranda, E., Bartolomé, T., Córdoba M.G. (2007). *Application of temperature-induced phase partition of proteins for the detection of smoked paprika adulteration by free zone capillary electrophoresis (FZCE)*. Food Chemistry, 105, 1219-1227.
- House, K. A., y Acree, T. E. (2002). *Sensory impact of free fatty acids on the aroma of a model Cheddar cheese*. Food Quality and Preference, 13, 481-488.
- Huff, J. R. (1991). *Hiv protease-a novel chemotherapeutic target for AIDS*. J Med Chem 34, 2305-2314.
- Ibama, E., y Griffiths, M.W. (1987). *Studies on a milk-coagulating enzyme, calotropain, obtained from sodom apple (Calotropis procera)*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1, 157-162.
- Innocente, N., D’ Agostin, P. (2002). *Formation of biogenic amines in a typical semihard Italian cheese*. Journal of Food Protection, 65, 1498-1501.
- Irigoyen, A., Izco, J. M., Ibáñez, F. C. y Torre, P. (2000). *Evaluation of the effect of rennet type on casein proteolysis in an ovine milk cheese by means of capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A, 881, 59-67.
- ISO 8586-1: 1993. *Sensory analysis - General guidance for the selection, training and monitoring of assessors – Part 1: Selected assessors*.
- ISO 8586-2: 1994. *Sensory analysis - General guidance for the selection, training and monitoring of assessors – Part 2: Experts*.

- ISO 660: 1996. *Determination of the Acid Value of the Fat (Reference Method)*. In: *International Standards Animal and Vegetable Oils and Fats*. International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland.
- ISO 6579: 2002. *Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of Salmonella spp.*
- ISO R-2917: 1999. *International Standards Meat and Meat Products. Measurement of the pH (Reference Method)*. International Organization for Standardization, Ginebra.
- ISO 15213: 2003. *Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions.*
- ISO 4120: 2004. *Sensory analysis-Methodology-Triangle test.*
- ISO 4121: 2006. *Sensory analysis guidelines for the use of quantitative response scales*; ISO: Geneva, Switzerland.
- Izco, J. M. y Torre, P. (2000). *Characterisation of volatile flavour compounds in Roncal cheese extracted by the purge and trap method and analysed by GC-MS*. Food Chemistry, 70, 409-417.
- Jensen, R. G., Ferris, A. M. y Lammi-Keefe, C. J. (1991). *The composition of milk fat*. Journal of Dairy Science, 74, 3228-3243.
- Jensen, R. G., Gander, G. W. y Sampugna, J. (1962). *Fatty acid composition of the lipids from pooled, raw milk*. Journal of Dairy Science, 45, 329-331.
- Jørgensen, S.S. y Sørensen, G. (1996). *A critical examination of some experimental variables in the 2-thiobarbituric acid (TBA) test for lipid oxidation in meat products*. Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung, 202, 205-210.
- Kalantopoulos, G. C. (1993). *Cheeses from ewe's and goat's milk*. In P. F. Fox (Ed.). *Cheese: Chemistry, physics and microbiology (Vol. 2)* (pp. 507-533). London, UK: Chapman & Hall.
- Kelly, M., Fox, P. F. y McSweeney, P. L. H. (1996). *Influence on saltin-moisture on proteolysis in Cheddar-type cheese*. Milchwissenschaft, 51, 498-501.

- Kelly, M., y Pepper, A. (1996). *Controlling Cynara cardunculus (Artichoke, Thistle, Cardoon, etc.)*. In J.E. Lovich, J. Randall, & M. D. Kelly (Eds.) *Proceedings of the California exotic pest plant council symposium* (Vol. 2, pp. 97 – 101). San Diego: California Exotic Pest Plant Council.
- Kinsella, J. E. (1975). *Butter flavour*. Food Technology, 29, 82-98.
- Koubaa, I., Damak, M., McKillop, A., y Simmonds, M. (1999). *Constituents of Cynara cardunculus*. Fitoterapia, 70, 212-213.
- Kraft, K. (1997). *Artichoke leaf extract: recent findings reflecting effects on lipid metabolism, liver and gastrointestinal tracts*. Phytomedicine 4, 369-378.
- Kristiansen, K. R., Deding, A. S., Jensen, D. F., Ärdo, Y., and Qvist, K. B. (1999). *Influence of salt content on ripening of semi-hard round-eyed cheese of Danbo-type*. Milchwissenschaft, 54, 19-23.
- Křízek, M. y Pelikanova, T. (1998). *Determination of seven biogenic amines in foods by micellar electrokinetic capillary chromatography*. Journal of Chromatography A, 815, 243-50.
- Kukic J., Popovic V., Petrovic S., Mucaji P., Ciric A., Stojkovic D., Sokovic M. (2008). *Antioxidant and antimicrobial activity of Cynara cardunculus extracts*. Food Chemistry 107, 861 – 868.
- Laemmli, U.K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 227, 680-685.
- Laleye, L. C., Simatd, R. E., Gosselin, C., Lee, B. H., Giroux, R. N. (1987). *Assesment of cheddar cheese quality by chromatographic analysis of free amino acids and biogenic amines*. Journal of Food Science, 52, 303-307.
- Lamas, E. M., Barros, R. M., Balcao, V. M. y Malcata, F. X. (2001). *Hydrolysis of whey proteins by proteases extracted from Cynara cardunculus and immobilized onto highly activated supports*. Enzyme Microb. Technol. 28, 642-652.
- Lane, C.N., Fox, P.F. (1996). *Contribution of starter and added lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese during ripening*. International Dairy Journal, 6: 715-728.

- Lange, J., Thomas, K., Wittmann, C. (2002). *Comparison of a capillary electrophoresis method with high-performance liquid chromatography for the determination of biogenic amines in various food samples*. Journal of Chromatography B, 779, 229-239.
- Lanteri, S., Di Leo, I., Ledda, L., Mameli, M. G. y Portis, E. (2001). *RAPD variation within and among populations of globe artichoke (Cynara scolymus L.), cv 'Spinoso sardo'*. Plant Breeding. 120:243–247.
- Lanteri, S., Acquadro, A., Saba, E. y Portis, E. (2004). *Molecular fingerprinting and evaluation of genetic distances among selected clones of globe artichoke (Cynara cardunculus L. Var. Scolymus L.) 'Spinoso sardo'*. J. Hortic. Sci. Biotech. 79: 863-870.
- Larmond, E. (1977). *Laboratory methods of sensory evaluation of foods*. Can. Dept. Agr. Publ., 1637.
- Lawrence, R. C., Creamer, L. K., y Gilles, J. (1987). *Texture development during cheese ripening*. Journal of Dairy Science, 70, 1748-1760.
- Lecanu, L., Ducruet, V., Jouquand, C., Gratadoux, J. J., y Feigenbaum, A. (2002). *Optimization of headspace solid-phase microextraction (SPME) for the odor analysis of surface-ripened cheese*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 3810-3817.
- Lee, J. H., Diono, R., Kim, G. Y., y Min, D. (2003). *Optimization of solid-phase microextraction analysis for the headspace volatile compounds for Parmesan cheese*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 1136-1140.
- Leroy, F., De Vuyst, L. (2004). *Lactic acid bacteria as cultures for the food fermentation*. Trends in Food Science and Technology, 15, 67-78.
- López-Díaz, T.M., Santos, J.A., González, C.J., Moreno, B., García, M.L. (1995). *Bacteriological quality of a traditional Spanish blue cheese*. Milchwissenschaft 50, 503-504.
- López – Molina, D., Heering, H. A., Smulevich, G., Tudela, J., Thorneley, R. N. F. García – Canovás, F., y Rodríguez –López, J. N. (2003). *Purification and characterization of a new cationic peroxidase from fresh flowers of Cynara scolymus L.* Journal of Inorganic Biochemistry, 94, 243-254.

- Loren, J. V. M. y Free, A. H. (1970). *Rapid and convenient salt measurement of Italian Cheese*. Journal of Dairy Science, 41, 317.
- Lourenço, P.M.L., de Castro, S., Martins, T.M., Clemente, A., y Domingos, A. (2002). *Growth and proteolytic activity of hairy roots from Centaurea calcitrapa: effect of nitrogen and sucrose*. Enzyme and Microbial Technology 31, 242-249.
- Lucey, J.A.; Johnson, M.E., Horne, D.S. (2003). Perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. Journal of Dairy Science, 86: 2725-2743.
- Lupo, M. P. (2001). *Antioxidant and vitamins in cosmetics*. Clin. Dermatol. 19, 467-473.
- Lynch, C. M., McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cogan, T.M., Drinan, F.B. (1996). *Manufacture of cheddar cheese with and without adjunct lactobacilli under controlled microbiological conditions*. International Dairy Journal, 6: 851-867.
- Maccarone, E., Fallico, B., Fanella, F., Mauromicale, G., Raccuia, S. A., Foti, S. (1999). *Possible alternative utilization of Cynara spp. Part II. Chemical characterization of their grain oil*. Ind. Crop Prod. 10, 229-237.
- Macedo, I. Q., Faro, C. J., y Pires, E. V. (1993). *Specificity and kinetics of the milk-clotting enzyme from Cardoon (Cynara cardunculus, L) toward bovine k-casein*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 41, 1537-1540.
- Macedo, A.C., Malcata F.X., y Oliveira J.C. (1993). *The technology, chemistry and microbiology of Serra cheese: a review*. Journal of Dairy Science, 76, 1725 – 1738.
- Macedo, I. Q., Faro, C. J., y Pires, E. V. (1996). *Caseinolytic specificity of cardosina, an aspartic protease from the cardoon Cynara cardunculus, L: Action on bovine α_s - and β -casein and comparison with chymosin*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44, 42-47.
- Macedo, A. C., y Malcata, F. X. (1996). *Changes in the major free fatty acids in Serra cheese throughout ripening*. International Dairy Journal, 6, 1087-1097.
- Macedo, A. C., Malcata, F. X. (1997). *Technological optimization of the manufacture of Serra cheese*. Journal of Food Engineering, 31, 433-447.

- Mah, J. H., Han, H. K., Oh, Y. J., Kim, M. G., Hwang, H. J. (2002). *Biogenic amines in Jetkoals, korean salted and fermented fish products*. Food Chemistry, 79, 239-243.
- McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Lucey, J.A., Jordan, K.N., Cogan, T.M. (1993). *Contribution of the indigenous microflora to the maturation of Cheddar cheese*. International Dairy Journal, 3: 613-634.
- McSweeney, P. L. H. y Sousa, M. J. (2000). *Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheese during ripening: A review*. Le Lait, 80, 293-324.
- Manabe, T. (1999). *Capillary electrophoresis of proteins for proteomic studies*. Electrophoresis, 20, 3116-3121.
- Mantell, J., Matheus, J. y Mckee, R. (1985). *Principles of Plant Biotechnology. An Introduction to Genetic Engineering in Plants*. Blackwell Scientific, Oxford.
- Marcos, A., Esteban, M.A., Martínez, E., Alcalá, M. y Fernández-Salguero, J. (1980). *Inactivación térmica de las proteinasas del cardo *Cynara humilis* L.: constantes cinéticas y termodinámicas*. Archivos de Zootecnia 29, 283-294.
- Marino, M., Maifreni, M., Moret, S., Rondinini, G. (2000). *The capacity of Enterobacteriaceae species to produce biogenic amines in cheese*. Letters in Applied Microbiology, 31, 169-173.
- Martín, A., Colín, B., Aranda, E., Benito, M.J. y Córdoba, M.G. (2007). *Characterization of Micrococaceae isolated from Iberian dry-cured sausages*. Meat Science, 75, 696-708.
- Martins, A.P.L., Vasconcelos M.M.P., Sousa, R.B. (1996). *Thistle (*C. cardunculus* L.) flower as a coagulant agent for cheesemaking. Short characterization*. Le Lait, 76, 473-477.
- Mas Mayoral, M., González Crespo, J. y Nieto Villaseca, M.J. (1991). *Casar cheese: production, physicochemical and microbiological characteristics*. Archivos de Zootecnia, 40, 359-369.
- Medina, M., Nuñez, M. (2004). *Cheeses made from ewes' and goats' milk. Cheese: Chemistry, Physics, and Microbiology. Third edition-Volume 2: Mayor cheese groups*.

- Menéndez, S., Centeno, J. A., Godínez, R., Rodríguez – Otero, J. L. (2000). *Effects of various Lactobacillus strains on the ripening and organoleptic characteristics of Arzua-Ulloa cheese*. Int. J. Food Microbiol. 59, 37 – 46.
- Merin, U., Talpaz, H., Fishman, S., (1989). *A mathematical model for the description of chymosin action on casein micelles*. Journal of Dairy Research, 56, 76-86.
- Mesías F.J., Rodríguez de Ledesma A., Escribano, M., Pulido F. (2001). El consumo de queso en Extremadura. pag 42, 88.
- Miranda, G., Hazé, G., Scanff, P., Pélissier, J.P., (1989). *Hidrolisis of α -lactalbumin by chymosin and pepsin: effect of conformation and pH*. Lait 69, 451-459.
- Mohamed, M.A., and O'Connor, C.B. (1999). *Calotropis procera* with emphasis on its use as a milk coagulating agent. A review. Egyptian Journal of Dairy Science, 27, 1-12.
- Molimard, P., & Spinnler, H. (1996). *Review: Compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheeses: origins and properties*. Journal of Dairy Science, 79, 169-184.
- Moret, S., Conte, L. (1996). *High-performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in foods. An analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics*. Journal of Chromatography A, 729, 363-369.
- Mucaji, P., Grancai, D., Nagy, M., Budesínský, M., y Ubik, K. (1999). *Triterpenoid saponins from Cynara cardunculus L*. Pharmazie, 54, 714-716.
- Mucaji, P., Grancai, D., Nagy, M., Visnovská, Z., y Ubik, K. (2000). *Apigenin-7-methylglucuronide from Cynara cardunculus, L*. Česká a Slovenská Farmacie, 49, 75-77.
- Mucaji, P., Grancai, D., Nagy, M., Budesínský, M., y Ubik, K. (2001). *Monodesmosidic saponins from Cynara cardunculus L*. Česká a Slovenská Farmacie, 50, 277-279.

Bibliografía

- Mucaji, P., Mucajiová, I., Nagy, M., Grancai, D. (2001). *Chemical composition of the flower oil of Cynara cardunculus, L. Journal of the Essential Oil Research*, 13, 357-358.
- Mutlu, A., y Gal, S. (1999). *Plant aspartic proteases: enzymes on the way to a function. Phisiol. Plant.* 105: 569-576.
- Nájera, A. I., Barron, L. J. R., y Barcina, Y. (1993). *Composition of the lipid fraction of cow's, ewe's and goat's cheeses and effects on quality. Revista Española de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, 33, 345-354.
- Netherlands Standard NEN 3059. (1969). *Butyrometric determination of the fat content of cheese (Gerber-Van Gulik method). Netherland Milk Dairy Journal*, 23, 214-220.
- Neviani, E., Bizarro, R., Righini, A., y Mucchetti, G. (1998). *Pecorino Toscano DOP: cheesemaking technology and microbiological characteristics. Ind. Latte* 34, 3-35.
- Novella, S., Veciana, M., Rpig, A., Trujillo, A., y Vidal, M. (2002). *Influence of starter and nonstarter on the formation of biogenic amine in goat cheese during ripening. Journal of Dairy Science*, 85 (10): 2471-2478.
- Núñez, M., Fernández del Pozo, B., Rodríguez Martín, M. A., Gaya, P., y Medina, M. (1991). *Effect of vegetable and animal rennet on chemical, microbiological, rheological and sensory characteristics of La Serena cheese. Journal of Dairy Research*, 58, 511-519.
- Ochoa, M. J., Fandos, A. (2004). *Evaluation of vegetable cardoon (Cynara cardunculus L.) populations for biomass production under rain-feed conditions. Acta Hortic.* 660, 235-239.
- O'Flaherty, B., Yang, W.P., Sengupta, S., y Cholli, A.L. (2001). *Fast detection of anionic components in sugar and wine samples using a novel device based on capillary zone electrophoresis. Food Chemistry*, 74, 111-118.

- Okigbo, L.M., Richardosn, G.H., Brown, R.J., Ernstrom, C.A., (1985). *Interaction of calcium, pH, temperature and chymosin during milk coagulation*. J. Dairy Research 68, 3135-3142.
- Oliveira, A. (2009). *Cardosin B expression during seed development: a comparative study between *Cynara cardunculus* and *Arabidopsis thaliana**, M.Sc. Thesis. Faculty of Sciences University of Porto, Botany Department.
- Oliveira, A., Pereira, C., Soares da Costa, D., Teixeira, J., Fidalgo, F., Pereira, S. y Pisarra, J. (2010). *Characterization of aspartic proteinases in *C. cardunculus* L. callus tissue for its prospective transformation*. Plant Science 178, 140-146.
- Orden de 9 de Octubre de 2001, por la que se aprueba el Reglamento de la Denominación de Origen Protegida (D.O.P.) “Torta del Casar”.
- Ordiales, E., Martín, A., Benito, M. J., Hernández, A., Ruíz-Moyano, S., & Córdoba, M. G. (2012). Technological characterisation by free zone capillary electrophoresis (FZCE) of the vegetable rennet (*Cynara cardunculus*) used in “Torta del Casar” cheese-making. *Food Chemistry*, 133, 227-235.
- Otte, J., Ardö, Y., Weimer, B., y Sorensen, J. (1999). *Capillary electrophoresis used to measure proteolysis in cheese*. Bulletin International Dairy Federation, 337, 10-16.
- Padmanabhan, S., Chitre, A., y Shastri, N.V. (1993). *Milk clotting protease isolated from *Dieffebachia maculate**. Nahrung, 37, 99-101.
- Pagnotta, M.A., M.T. Carderelli, N.A. Rey Muñoz, M. Tucci, and F. Saccardo. (2004). *Assessment of genetic variation in artichoke of ‘Romanesco’ type by molecular markers*. Acta Hortic. 660: 99-104.
- Paris, R., y Moyse, H. (1971). Précis de matière médicale (tome III). Paris: Masson et Cie.
- Pascual Anderson, M.R., Calderón y Pascual, V. (1999). *Microbiología Alimentaria. Metodología Analítica para alimentos y Bebidas*. 2º Edición. Ed. Díaz de Santos.

Bibliografía

- Pastorino, A.J., Hansen, C.L., McMahon, D.J. (2003). *Effect of salt on structure-function relationships of cheese*. Journal of Dairy Science, 86: 60-69.
- Perea, S., de Labastida, E. F., Nájera, A. I., Chávarri, F., Virto, M., de Renobales, M., y Barron, L. J. R. (2000). *Seasonal changes in the fat composition of Lacha sheep's milk used for Idiazabal cheese manufacture*. European Food Research and Technology, 210, 318-323.
- Pereira, C. S., Soares da Costa, C., Pereira, S., Moura Nogueira, F., Albuquerque, P. M., Teixeira, J., Faro, C., Pizarra, J. (2008). *Cardosins in postembryonic development of cardoon: towards an elucidation of the biological function of plant aspartic proteinases*. Protoplasma 232, 203-213.
- Pereira, C.I.; Gomes, A.M.P.; Malcata, F.X. (2009). *Microstructure of cheese: processing, technological and microbiological considerations*. Trends in Food Science and Technology, 20, 213-219.
- Pereira, C. I.; Neto, D. M.; Capucho, J. C.; Gião, M. S.; Gomes, A. M.P.; Malcata, F. X. (2010). *How three adventitious lactic acid bacteria affect proteolysis and organic acid production in model Portuguese cheese manufactured from several milk sources and two alternative coagulants*. Journal of Dairy Science, 93: 1335-1344.
- Pereira, C. I.; Graça, J. A.; Ogando, N. S.; Gomes, A. M.P.; Malcata, F. X. (2010). *Influence of bacterial dynamics upon the final characteristics of model Portuguese traditional cheeses*. Food Microbiology, 27, 339-346.
- Pérez-García, F., Adzet, T., Canigüeral, S. (2000). *Activity of artichoke leaf extract on reactive oxygen species in human leukocytes*. Free Rad. Res. 33, 661-665.
- Peschel, W., Sánchez – Rabaneda, F., Diekmann, W., Plescher, A., Gartzia, I., Jimenez, D., Lamuela-Raventos, R., Buxaderas, S., Codina, C. (2006). *An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes*. Food Chem. 97, 137-150.
- Picón, A., Gaya, P., Medina, M. y Nuñez, M. (1995). *Kinetics of milk coagulation by mixtures of cyprosin and chymosin*. Michwissenschaft 50, 393-395.

- Pimentel C., Van der Straeten, D., Pires, E., Faro, C., Rodrigues-Pousada, C. (2007). *Characterization and expression analysis of the aspartic protease gene family of Cynara cardunculus L.* FEBS J 274, 2523-2539.
- Pinelli, P., Agostini, F., Comino, C., Lanteri, S., Portis, E., y Romani, A. (2007). *Simultaneous quantification of caffeoyl esters and flavonoids in wild cultivated cardoon leaves.* Food Chemistry, 105 (4), 1695-1701.
- Pintado, A.I., Tavares, T.G., Tavaira, F.K., Malcata, F.X. (2010). *Tradition versus modernism in cheesemaking technology: a Portuguese case study encompassing plant coagulant, non-bovine milks and adventitious microflora.* The Australian Journal of Dairy Technology. Vol. 65, 128-134.
- Pires, E., Faro, C., Macedo, I., Esteves, C., Morgado, J., Veríssimo, P., Dias – Pereira y Gomes, D. (1994). *Flor do cardo versus quimosina no fabrico de queijos artesanais.* Revista da Sociedade Portuguesa de Química, 54, 66 – 68.
- Plotowska, B. y Wardencki, W. (2007). *Aromagrams – Aromatic profiles in the appreciation of food quality.* Food Chemistry, 101, 845-872.
- Portis, E., Acquadro, A., Comino, C., Mauromicale, G., Saba, E., Lanteri, S. (2005a). *Genetic source of island populations of wild cardoon (Cynara cardunculus L. var. sylvestris (Lamk) Fiori) detected by AFLPs and SSRs.* Plant Science 169, 199-210.
- Portis, E., Mauromicale, G., Barchi, L., Mauro, R. y Lanteri, S. (2005b). *Population structure and genetic variation in autochthonous globe artichoke germplasm from Sicily Island.* Plant Sci. 168:1591-1598.
- Portis, E., Barchi, L., Acquadro, A., Macua, J.I. y Lanteri, S. (2005c). *Genetic diversity assessment in cultivated cardoon by AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) and microsatellite markers.* Plant Breeding. 124:299–304.
- Pouillet, B., Huertas, M., Sánchez, A., Cáceres, P., y Larriba, G. (1991). *Microbial study of Casar de Cáceres cheese throughout ripening.* Journal Dairy Res. 58, 231-238.

Bibliografía

- Pouillet, B., Huertas, M., Sánchez, A., Cáceres, P., y Larriba, G. (1991). *Main lactic acid bacteria isolated during ripening of Casar de Cáceres cheese*. Journal Dairy Res. 60, 123-127.
- Raccuia, S. A., Melilli, M. G. (2004). *Cynara cardunculus L., a potential source of inulin in Mediterranean environment: screening of genetic variability*. Aust. J. Agric. Res. 55, 693-698.
- Raccuia, S.A., Mainolfi, A., Mandolino, G. y Melilli, G. (2004). *Genetic diversity in Cynara cardunculus revealed by AFLP markers: comparison between cultivars and wild types from Sicily*. Plant Breeding. 123:280-284.
- Ramalho- Santos, M., Veríssimo, P., Faro, C., y Pires, E. (1996). *Action on bovine α_{s1} -casein of cardosins A and B, aspartic proteinases from the flowers of the cardoon Cynara cardunculus L.* Biochimica et Biophysica Acta, 1297, 83-89.
- Ramalho- Santos, M., Pisarra, J. Veríssimo, P., Pereira, S., Salema, R., Pires, E., y Faro, C. (1997). *Cardosin A, an abundant aspartic proteinase, accumulates in protein storage vacuoles in the stigmatic papillae of Cynara cardunculus L.*, Planta 203, 204-212.
- Ramalho- Santos, M., Veríssimo, P., Cortes, L., Samyn, B., Van Beeumen, J., y Pires, E. (1998). *Identification and proteolytic processing of procardosin A*. Eur. J. Biochem. 255, 133-138.
- Raven, P., Evert, R., y Eichhorn, S., (1999). *Biology of plants*. W. H. Freeman and Company, New York.
- Roa, I., López, M.B., Mendiola, F.J. (1999). *Residual clotting activity and ripening properties of vegetable rennet from Cynara cardunculus in La Serena cheese*. Food Research International, 32, 413-419.
- Recio, I., Amigo, L. y López-Fandiño, R. (1997). *Assesment of the quality of dairy products by capillary electrophoresis of milk proteins*. Journal of Chromatography B, 697, 231-242.
- Recio, I., Ramos, M, y López-Fandiño, R. (2001). *Capillary electrophoresis for the analysis of food proteins of animal origin*. Electrophoresis, 22, 1489-1502.

- Reglamento (CE) 1491/2003 de la Comisión Europea del 25 de Agosto: Registro de la denominación de origen protegida Torta del Casar en el registro de denominaciones de origen protegidas e indicaciones geográficas protegidas.
- Roberts, D., Hooper, W. y Greenwood, M. (2000). *Practical Food Microbiology. Methods for the examination of food for micro-organisms of public health significance*. 2ª ed. London NWG SDF, UK. 169-171.
- Robinson, R.K. y Wilbey, R.A. (1998). *Cheesemaking Practice*, 3rd edition. Gaithersburg: Aspen Publishers.
- Roessler, E.B., Pangborn, R.M., y Stone, M. (1978). *Expanded statistical tables for estimating significance in paired-difference, duo-trio and triangle tests*. Journal of Food Science, 43 (3), 340-343.
- Roseiro, M.L.B. (1991) *Ewe's milk cheesemaking in Portugal using a vegetable rennet (a review)*. Sheep Dairy News, 8, 74-75.
- Roseiro, M.L.B. and Barbosa, M. (1996). *Portuguese artisanal cheeses*. In Artisanal European Cheeses, pp 79-92. Brussels: European Commission Science Research Development.
- Roseiro, L.B.; Gómez-Ruiz, J.A.; García-Risco, M.; Molina, E. (2003a). *Vegetable coagulant (Cynara cardunculus) use evidenced by capillary electrophoresis permits PDO Serpa cheese authentication*. Lait, 83, 343-350.
- Roseiro, L.B.; Barbosa, M.; Ames, J.M.; Wilbey, R.A. (2003b). *Cheesemaking with vegetable coagulants-the use of Cynara L. for the production of ovine milk cheeses*. International Journal of Dairy Technology, Vol. 56, N° 2, 76-85.
- Rossoni, G., Grande, S., Galli, C. and Visioli, F. (2005). *Wild artichoke prevents age associated loss of vasomotor function*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 10291-10296.
- Rottenberg, A., and Zohary, D. (1996). *The wild ancestry of the cultivated artichoke*. Genet. Resour. Crop. Evol. 43, 53-58.

Bibliografía

- Ruiz J., Fernández – Salguero, J., Esteban M.A., Marcos, A. (1984). *Principales parámetros que definen la composición del queso Torta del Casar*. Archivos de zootecnia, vol. 33, num. 127, p. 301.
- Ruíz, J., Cava, R., Ventanas, J. y. Jensen M.T. (1998). *Headspace solid phase microextraction for the análisis of volatiles in a meat product: dry cured Iberian ham*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 4688-4694.
- Sales-Gomes, M. and Lima-Costa, M.E. (2008). *Inmobilization of Endoproteases from Crude Extract of Cynara cardunculus L. flowers*. Food Science and Technology International, 14, 271-276.
- Sambrook, J., Fritsch, EF. y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab. Press. Cold Spring Harbor, NY, USA, 17-20.
- Sampaio, G. (1947). Flora portuguesa. Instituto de Alta Cultura, Lisboa.
- Sampaio, P. N., Fortes, A. M., Cabral, J. M. S., Pais, M. S. y Fonseca, L. P. (2008). *Production and characterization of recombinant Cyprosin B in Saccharomyces cerevisiae (W303-1A) strain*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 105, N° 4, 305-312.
- Sánchez, D., Carmona, M. A., Gómez, R., y Fernández – Salguero, J. (1995). *Evolution of some microbial groups during ripening of Los Pedroches cheese*. Alimentaria, 33: 87-90.
- Sanjuán, E., Fernández-Salguero, J. (1994). *Influencia de algunos factores sobre el tiempo de coagulación por cuajo vegetal (Cynara sp.)*. Aliment. Equip. Technol., 13, 69-73.
- Sanjuán, E., Millán, R., Saavedra, P., Carmona, M.A., Gómez, R., Fernández-Salguero, J. (2002). *Influence of animal and vegetable rennet on the physicochemical characteristics of Los Pedroches cheese during ripening*. Food Chemistry, 78, 281-289.
- Sarmento, A .C., Oliveira, C. S., Duarte, A. S., Pires, E., Barros, M. T. (2006). *Evaluation of cardosin A as a probe for limited proteolysis in non-aqueous*

- environments-complex substrates hydrolysis*. Enzyme Microb Technol 38, 415-421.
- Sarmiento, A. C., Lopes, H., Oliveira, C. S., Vitorino, R., Samyn, B., Sergeant, K., Debyser, G., Van Beeumen, J., Domingues, P., Amado, F., Pires, E., Domingues, M. P. M., Barros, M. T. (2009). *Multiplicity of aspartic proteinases from Cynara cardunculus*, L. Planta, 230, 429-439.
- Scott, R. (1991). Fabricación de quesos. Editorial Acribia. S.A. Zaragoza, España, 520.
- Serradilla, M.J., Martín, A., Aranda, E., Hernández, A., Benito, M.J., López-Corrales, M., Córdoba, M.G. (2008). *Authentication of “Cereza del Jerte” sweet cherry varieties by free zone capillary electrophoresis (FZCE)*. Food Chemistry, 111, 457-461.
- Sidrach, L., García – Canovás, F., Tudela, J., Rodríguez – López, J.N. (2005). *Purification of cynarases from artichoke (Cynara scolymus, L.): enzymatic properties of cynarase A*. Phytochemistry, 66, 41 – 49.
- Siek, T. J., Albin, I. A., Sather, L. A., y Lindsay, R. C. (1971). *Comparison of flavor thresholds of aliphatic lactones with those of fatty acids, esters, aldehydes, alcohols, and ketones*. Journal of Dairy Science, 54, 1-4.
- Silla-Santos, M. H. (1996). *Biogenic Amines: their importance in foods*. International Journal of Food Microbiology, 29 (2/3): 213 – 231.
- Silva, S.V., y Malcata F.X. (1999). *On the activity and specificity of cardosin B, a plant proteinase on ovine caseins*. Food Chemistry, 67, 373 – 378.
- Silva, S.V., Malcata, F.X. (2000). *Comparative catalytic activity of two plant proteinases upon caprine caseins in solution*. Food Chemistry, 71, 207-214.
- Silva, S.V., Allmere, T., Malcata, F.X., Andrén A. (2003). *Comparative studies on the gelling properties of cardosins extracted from Cynara cardunculus and chimosin on cow’s skim milk*. International Dairy Journal 13, 559-564.
- Silva, S. V., y Malcata, F. X. (2005). *Studies pertaining to coagulant and proteolytic activities of plant proteases from Cynara cardunculus*. Food Chemistry, 89, 19 – 26.

Bibliografía

- Simões, I., Faro, C. (2004). *Structure and function of plant aspartic proteinases*. Eur. J. Biochem. 271, 2067-2075.
- Slanina, J., Taborska, E., Bochorakowa, H., Humpa, O., Robinson, W. E., y Schram, K. H. (2001). *New and facile method of preparation of the anti-HIV agent 1,3-dicaffeoylquinic acid*. Tetrahedron Letters, 42, 3383-3385.
- Sonnante, G., A. De Paolis, y D. Pignone. (2004). *Relationships 405 among artichoke cultivars and some related wild taxa based on AFLP markers*. Plant Genetic Resour. 1:125–133.
- Sousa, M. J. C. F. (1993). *Plant Rennet Substitute from Flowers of Cynara cardunculus*. M. Sc. Thesis, National University of Ireland Cork.
- Sousa, M. J. C. F. (1998). *Characterization of the Proteolytic Action of the Flowers of Cynara cardunculus in Ovine, Caprine and Bovine Cheeses*, Ph.D. Thesis, Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa, Porto, Portugal.
- Sousa, M. J. y Malcata, F. X. (1997a). *Comparison of plant and animal rennets in terms of microbiological, chemical and proteolysis characteristics of ovine cheese*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 74-81.
- Sousa, M. J. y Malcata, F. X. (1997b). *Comparative biochemical evolution during ripening of bovine, ovine and caprine cheeses manufactured with extracts of flowers of Cynara cardunculus*. Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung und-Forschung, 205, 104-107.
- Sousa, M. J., y Malcata, F. X. (1997c). *Ripening of ovine milk cheeses: Effects of plant rennet, pasteurization, and addition of starter on lipolysis*. Food Chemistry, 59, 427-432.
- Sousa, M. J. y Malcata, F. X. (1998a). *Identification of peptides from ovine milk cheese manufactured with animal rennet or extracts of Cynara cardunculus as coagulant*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 4034-4041.

- Sousa, M. J. y Malcata, F. X. (1998b). *Proteolysis of ovine and caprine caseins in solution by enzymatic extracts of Cynara cardunculus cheese*. *Enzyme Microbiology and Technology*, 22, 305-314.
- Sousa, M.J., y Malcata, F.X. (2002). *Advances in the role of a plant coagulant (Cynara cardunculus) in vitro and during ripening of cheeses from several milk species*. *Le Lait* 82, 151-170.
- Sousa, M.J., Ardö, Y. y McSweeney, P.L.H. (2001). *Advances in the study of proteolysis during cheese ripening*. *International Dairy Journal* 11, 327-345.
- St-Gelais, D. y Haché, S. (2005). *Effect on β -casein concentration in cheese milk on rennet coagulation properties, cheese composition and cheese ripening*. *Food Research International*, 38, 523-531.
- Standara, S., Vesela, M., Drdak, M. (2000). *Determination of biogenic amines in cheese by ion exchange chromatography*. *Nahrung*, 44, 28-31.
- Stratton, J. E., Hutkins, R. W., Taylors, S. L. (1991). *Biogenic amines in cheese and other fermented foods. A review*. *Journal of Food Protection*, 54, 460-470.
- Stryer, L. (1988). *Biochemistry* (3rd ed.) New York: W. H. Freeman and Company.
- Swedberg, S. (1997). *Capillary electrophoresis: Principles and applications*. In: *Instrumental methods in food analysis*. Eds.: Pare, J.R.J. and Belanger, J.M.R. Elsevier Science, New York. 367 – 394.
- Tavaria, F. K., Sousa, M. J., Domingos, A., Malcata, F. X., Brodelius, A., Clemente, A., y Pais, M. S. (1997). *Degradation of caseins from different milk types by extracts of Centaurea calcitrapa*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3760-3765.
- Tavaira, F. K., y Malcata, F. X. (1998). *Microbiological characterization of Serra da Estrela cheese throughout its AOP region*. *J. Food Prot.* 61, 601-607.
- Tavaria F.K., Sousa, M.J., and Malcata, F.X. (2001). *Storage and lyophilization effects of extracts of Cyanra cardunculus on the degradation of ovine and caprine caseins*. *Food chemistry*, 72, 79 – 88.

Bibliografía

- Tavaria F. K., Dahl, S., Carballo, F. J. & Malcata, F.X. (2002). *Amino acid catabolism and generation of volatiles by lactic acid bacteria*. Journal Dairy Science, 85, 2462-2470.
- Tavaira, F.K. y Malcata, F.X. (2003). *Enzyatic activities of non-starter lactic acid bacteria isolated from a traditional Protuguese cheese*. Enzyme Microb. Echnol. 33, 236-243.
- Tavaria F.K., Ferreira, A. C., y Malcata, F.X. (2004). *Volatile free fatty acids as ripening indicators for Serra da Estrela Cheese*. Journal Dairy Science, 87, 4064-4072.
- Tomasini, A., Bustillo, G. y Lebeault, J. M. (1993). *Fat lypolized with a commercial lipase for the production of Blue cheese flavour*. International Dairy Journal, 3, 117-127.
- Trionfetti Nisini, P., P. Crinò, M.A. Pagnotta, R. Tavazza, and G. Ancora. 2007. *Recovery and characterization of Italian artichoke traditional landraces of 'Romanesco' type*. ISHS Acta Hort. 730:101–106.
- Trujillo, A. J., Guamis, B., Laencina, J., López, M. B. (2000). *Proteolytic activities of some milk clotting enzymes on ovine casein*. Food Chemistry, 71, 449-457.
- Tsouli, J. (1974). *Etude comparée de l'activité enzymatique de 3 variétés d'artichauts du genre Cynara cardunculus L. sur la coagulation du lait*. Le Lait 537 415-421.
- Tutin, T., Heywood, V., Burges, N., Moore, D., Valentine, D., Walters, S. and Weeb, D. (1976). *Flora Europaea*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Urbach, G. (1993). *Relations between cheese flavor and chemical compositions*. International Dairy Journal, 3, 389-422.
- Urbach, G. (1997). *The flavor of milk and dairy products: II. Cheese: Contribution of volatile compounds*. International Journal of Dairy Technology, 50, 79-89.
- Valdés, B., Talavera, S. y Fernández-Galiano, E. (1987). En: *Flora Vascular de Andalucía Occidental*. Ketres Editora, S.A. Barcelona. España.
- Valentao, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Andrade, P. B., Seabra, R. M. y Bastos, M. L. (2002). *Antioxidative porperties of cardoon (Cynara cardunculus L.) infuzion*

- against superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 4989-4993.
- Van Hekken, D. L., y Holsinger, V. H. (2000). *Use of cold microfiltration to produce unique β -casein enriched milk gels*. Lait, 80, 69-76.
- Vassar, R. (2004). *BACE1-the beta-secretase enzyme in Alzheimer's disease*. J. Mol Neurosci 23, 105-113.
- Veisseyre, R. (1972). Lactología Técnica. Recogida, tratamiento y transformación de la leche en países templados y calientes. Primera parte. Capítulo I. Caracteres, Composición y Estructura de la leche. Capítulo IX. Técnicas queseras. Editorial Acribia. Zaragoza. España, 643.
- Veloso, A.C.A., Teixeira, N., Peres, A.M., Mendonça, A., Ferreira, I.M.P.L.V.O. (2004). *Evaluation of cheese authenticity and proteolysis by HPLC and urea-polyacrilamide gel electrophoresis*. Food Chemistry, 87, 289-295.
- Verissimo, P., Esteves, C., Faro, C. y Pires, E. (1995). *The vegetable rennet of Cynara cardunculus L. contains two proteinases with chimosin and pepsin-like specificities*. Biotechnology Letters, 17, 621 – 626.
- Verissimo, P., Faro, C., Moir, A.J., Lin, Y., Tang, J., y Pires, E. (1996). *Purification, characterization, and partial amino acid sequencing of two new aspartic proteinases from fresh flowers of Cynara cardunuculus, L.* European Journal Biochemistry. 235, 762 – 768.
- Vieira de Sá, F., Barbosa, M. (1972). *Cheese making with a vegetable rennet from cardo*. J Dairy Res 39, 335-343.
- Vieira, M., Pissarra, J., Veríssimo, P., Castanheira, P., Costa, Y., Pires, E. and Faro, C. (2001). *Molecular cloning and characterization of cDNA encoding cardosin B, an aspartic proteinase accumulating extracellularly in transmitting tissue of Cyanra cardunculus, L.* Plant. Mol. Biol. 45, 529-539.
- Villaseñor, M. J., Valero, E., Sanz, J., Martínez-Castro, I. (2000). *Analysis of volatile compounds of Manchego cheese by dynamic headspace followed by automatic thermal desorption-GCMS*. Milchwissenschaft, 55, 378-382.
- Vinci, G., Antonelli, M. L. (2002). *Biogenic amines: quality index of freshness in red and white meat*. Food Control, 13, 519-524.

Bibliografía

- Vioque, M., Gómez, R., Sánchez, E., Mata, C., Tejada, L., and Fernández – Salguero, J. (2000). Chemical and microbiological characteristics of ewe's milk cheese manufactured with extracts from flowers of *Cynara cardunculus* and *Cynara humilis* as coagulants. *J. Agric. Food Chem.* 48, 451-456.
- Visser, S. (1993). *Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: an overview*. *Journal of Dairy Science*, 76, 329-350.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. y Zabeau, M. (1995). *AFLP, a new technique for DNA fingerprinting*. *Nucleic Acids Research*. 23, 4407-4414.
- Weber, K.; Osborn, M. (1969). *The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*. *Journal of Biological Chemistry*. 244:4406-4412.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. y Tingey, S.V. (1990). *DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers*. *Nucleic Acids Research*. 18, 6531 – 6535.
- Wolfe, M. y Primrose, S. (2004). *Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud*. *Trends in Biotechnology*. 22 (5), 222 – 226.
- White, P.C., Cordeiro M.C., Arnold, D., Brodelius, P.E., Kay, J. (1999). *Processing, activity, and inhibition of recombinant cyprosin, as aspartic proteinase from cardoon (Cynara cardunculus)*. *J. Biol. Chemistry*, 274, 16685 – 16693.
- Whiteley C. G. (2000). *Enzyme kinetics: partial and complete uncompetitive inhibition*. *Biochemical Education* 28, 144-147.
- www.dairyco.org.uk (FAO, 2008)
- Yousif, B. H., McMahon, D. J., and Shammet, K.M. (1996). *Milk-clotting enzyme from Solanum dobiium plant*. *International Dairy Journal*, 6, 637-644.
- Zino, M., Condurso, C., Romeo, V., Giuffrida, D., y Verzera, A. (2005). *Characterization of "Provola di Nebrodi" a typical Sicilian cheese, by volatile analysis using SPME-GC/MS*. *International Dairy Journal*, 15, 585-593.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. y Labuda, D. (1994). *Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification*. *Genomics*. 20, 176-183.

VIII. RESUMEN

El objetivo de este estudio fue caracterizar las especies de cardo silvestres de Extremadura, a nivel morfológico, molecular, fenotípico y tecnológico, así como evaluar la influencia del año de recolección y el estado de maduración de la flor del cardo, y el uso de diferentes plantas de cardo *Cynara cardunculus* en las características finales del queso. Se recogieron un total de 205 muestras de cardo de las especies *Silybum marianum*, *Cirsium arvense*, *Onopordum nervosum*, *Cynara humilis*, *Cynara scolymus* y *Cynara cardunculus*, de diferentes localizaciones de la región de Extremadura. Todas ellas pueden ser perfectamente caracterizadas y diferenciadas mediante técnicas moleculares, en concreto RAPD y SSRs, perfiles de proteínas FZCE y SDS-PAGE, y a través de su actividad coagulante y proteolítica frente a las caseínas de la leche.

La especie *Cynara cardunculus* es la que autoriza la DOP “Torta del Casar” para ser empleada como cuajo vegetal, por ello, una vez identificada y caracterizada, el trabajo se centra en estudiar la influencia de esta planta en las características finales del queso “Torta del Casar”.

Se encontró gran variabilidad genética entre y dentro de las poblaciones de *Cynara cardunculus* recogidas en Extremadura, lo que se tradujo en diferentes perfiles proteicos, así como en diferencias a nivel de propiedades tecnológicas del cuajo, actividad coagulante y proteolítica. Se estudia la influencia de esta variabilidad en las características del producto final, ya que puede ser una de las razones de la falta de homogeneidad que se relaciona con el queso “Torta del Casar”. Para ello se elaboraron 16 lotes de quesos tipo “Torta del Casar” a partir de 16 muestras diferentes de *C. cardunculus*. Las propiedades físico-químicas, microbiológicas, de textura y sensoriales de “Torta del Casar” fueron evaluadas durante la maduración de los quesos y relacionadas con las propiedades tecnológicas de los cuajos usados en su elaboración.

Se desarrolló un procedimiento basado en el análisis de proteínas mediante FZCE, para muestras de cardo (*C. cardunculus*), en función de la localización, año de recolección y estado de maduración de la flor. Para la técnica FZCE se empleó un protocolo de extracción de proteínas solubles en metanol. Este método presentó buena repetibilidad de los tiempos de migración y mostró mayor efectividad para distinguir las propiedades tecnológicas (actividad coagulante y actividad proteolítica) de los cuajos que la técnica SDS-PAGE. Además, tres de los picos encontrados en los

electroferogramas FZCE pueden considerarse como una buena herramienta para predecir el impacto de los cuajos en la cremosidad y en la aceptabilidad global del queso “Torta del Casar”.

Las diferencias encontradas entre las plantas de *C. cardunculus* en cuanto a su actividad coagulante y proteolítica no se deben al año de recolección, ni a la localización, ni tampoco al estado de maduración de la flor. Sin embargo, estas diferencias ejercen gran influencia tanto en los parámetros físico-químicos de los quesos al inicio de la maduración, como en la textura y el análisis sensorial del producto final. La actividad coagulante del extracto, tras 24 h de maceración, y la intensidad de degradación de β -caseína se consideran como una buena herramienta para predecir el impacto del cuajo vegetal en la cremosidad del queso “Torta del Casar”.

A lo largo de la maduración de los quesos se observó una importante proteólisis que dio lugar a la generación de compuestos nitrogenados no proteicos. Se destaca la relación entre la actividad coagulante (24 h de maceración) y la generación de nitrógeno aminoácido, y el hecho de que las aminos biógenas no estaban relacionadas con la alta actividad del cuajo. El cuajo con alta actividad coagulante (24 h de maceración) influyó en la cremosidad, la viscosidad, el tipo de queso y la aceptabilidad del queso. Sin embargo, la alta actividad proteolítica del cuajo influyó negativamente en los parámetros de acidez, amargor y cremosidad. De modo que la planta de cardo más apropiada para obtener el cuajo será aquella que muestre una alta actividad coagulante y una moderada actividad proteolítica sobre β -caseína.

Analizada la influencia del cuajo sobre las características del producto final, y teniendo en cuenta que no todos los cambios que ocurren en la matriz del queso se deben al cuajo, se aborda la influencia de la microbiología en las características finales de “Torta del Casar”, siendo el cuajo una de las fuentes de los microorganismos que actúan en este producto.

Los recuentos en las materias primas muestran que la población de bacterias ácido lácticas del queso procede principalmente de la leche, mientras que las poblaciones de psicrotrofos y enterococos proviene de los cuajos. La correlación entre los parámetros de proteólisis y los recuentos microbianos revela que el efecto de los microorganismos en la proteólisis primaria es baja y el grupo de los enterococos influye sobre NA e IGA a los 30 días de maduración, y NPN e IP a los 60 días. Los psicrotrofos, bacterias ácido

láticas y enterococos condicionan la adhesividad, y las enterobacterias y coliformes ejercen una influencia negativa sobre la textura. Los grupos microbianos que influyen en la cremosidad y la viscosidad son psicrotrofos, bacterias ácido lácticas, lactococos y staphylococos. Sería deseable controlar el desarrollo de las bacterias ácido lácticas, lactococos y enterococos, en la elaboración de “Torta de Casar”, siendo esencial el desarrollo de un cultivo iniciador adecuado a este producto tradicional.

ÍNDICE

I-INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. EL QUESO	3
I.1.1. Definición de queso	3
I.1.2. Producción de queso a nivel mundial, nacional y regional.....	3
I.1.3. Tipos de quesos más importantes	8
I.1.4. La Torta del Casar.....	14
I.1.4.1. Descripción de la Torta del Casar	14
I.1.4.2. Proceso de elaboración de la Torta del Casar	15
I.1.4.3. Características de calidad de la Torta del Casar.....	17
I.1.4.4. Flora característica de la Torta del Casar	18
I.1.4.5. Presencia de aminas biógenas en quesos	21
I.1.4.6. Proteólisis.....	23
I.1.4.7. Lipólisis	24
I.1.4.8. Compuestos volátiles en el queso	27
I.2. EL CUAJO.....	30
I.2.1. Características del cuajo	30
I.2.2. <i>Cynara cardunculus</i> , L.	35
I.2.2.1. Descripción de <i>Cynara cardunculus</i> , L.	35
I.2.2.2. Otros usos de <i>Cynara cardunculus</i>	37
I.2.3. Caracterización del cardo usado como cuajo vegetal	38
I.2.3.1. Caracterización Morfológica.....	39
I.2.3.2. Caracterización Molecular	39
I.2.3.3. Caracterización mediante análisis de proteínas.....	40
I.2.4. Obtención del cuajo para la elaboración de la “Torta del Casar”	42
I.2.5. Enzimas presentes en las flores de “ <i>Cynara cardunculus</i> ”.....	42
I.2.6. Actividad proteolítica del cuajo obtenido de <i>Cynara cardunculus</i>	47
I.2.7. Actividad coagulante del cuajo procedente de <i>Cynara cardunculus</i>	51
I.2.8. Actividad antimicrobiana de <i>Cynara cardunculus</i>	53
I.2.9. Problemas asociados a la utilización del cuajo procedente de <i>Cynara cardunculus</i> en la actualidad	54
II. OBJETIVOS	57
III. MATERIAL Y MÉTODOS	61
III.1. Material	63
III.1.1. Reactivos químicos y medios de cultivo	63

III.1.2. Aparatos	63
III.1.3. Material biológico	68
III.2. Métodos.....	74
III.2.1. Toma de muestras de cardos de diferentes especies (2006). Toma de muestras de <i>Cynara cardunculus</i> (2007-09).	74
III.2.2. Caracterización morfológica	75
III.2.3. Extracción de ADN	75
III.2.4. Análisis de AND mediante técnicas RAPD-PCR	76
III.2.5. Análisis de ADN mediante microsatélites (SSRs)	81
III.2.6. Extracción de proteínas del cuajo vegetal para análisis mediante SDS-PAGE.....	85
III.2.7. Perfil de proteínas del cuajo mediante SDS-PAGE	85
III.2.8. Extracción de proteínas del cuajo vegetal para análisis mediante FZCE.	87
III.2.9. Perfil de proteínas del cuajo mediante FZCE.....	87
III.2.10. Purificación de cardosinas.....	88
III.2.11. Determinación de la actividad proteolítica del cuajo	89
III.2.12. Determinación de la actividad coagulante del cuajo	89
III.2.13. Determinación de la actividad antimicrobiana del cuajo	90
III.2.14. Elaboración de quesos tipo “Torta del Casar”	92
III.2.15. Análisis de los parámetros físico – químicos	98
III.2.16. Determinaciones microbiológicas	100
III.2.16.1. Preparación de las muestras para análisis microbiológico	100
III.2.16.2. Recuentos	100
III. 2.17. Análisis de las proteínas del lactosuero y las caseínas.....	105
III.2.17.1. Preparación de los extractos de proteínas del lactosuero y las caseínas.....	105
III.2.17.2. Determinación de la concentración de proteínas y geles de poliacrilamida (SDS y UREA-PAGE).....	106
III.2.18. Determinación del nitrógeno total.....	107
III.2.19. Determinación del nitrógeno no proteico y nitrógeno aminoacídico	107
III.2.19.1. Preparación del extracto	108
III.2.19.2. Cuantificación del nitrógeno no proteico (NNP).....	108
III.2.19.3. Cuantificación del nitrógeno aminoacídico (NA)	108
III.2.19.4. Índices de proteolisis	109
III.2.20. Determinación de aminos biógenas.....	109
III.2.21. Extracción y cuantificación de la grasa.....	110
III.2.22. Determinación del índice de acidez.....	111

III.2.23. Determinación del contenido en malondialdehído (MDA) mediante el test de ácido tiobarbitúrico (TBA)	111
III.2.24. Determinación de compuestos volátiles	112
III.2.25. Determinación de aniones de los quesos	113
III.2.26. Análisis instrumental de la textura	114
III.2.27. Análisis sensorial.....	116
III.2.27.1. Test triangular	116
III.2.27.2. Test descriptivo	117
III.2.27.3. Test hedónico	120
III.2.28. Estudio estadístico de los resultados	120
IV. RESULTADOS.....	121
IV.1. CAPÍTULO I	123
IV.1.1. DNA typing methods for differentiation of wild cardoon used in the elaboration of “Torta del Casar” cheese.....	125
IV.1.2. Characterisation by protein profiles methods for detection of the vegetable rennet (<i>Cynara cardunculus</i>) adulteration used in “Torta del Casar” cheese-making.....	157
IV.1.3. Influencia de la preparación y almacenamiento del extracto de <i>Cynara cardunculus</i> en su actividad coagulante.	193
IV.2. CAPÍTULO II	219
IV.3. CAPÍTULO III.....	229
IV.3.1. Influence of technological properties of vegetable rennet (<i>Cynara cardunculus</i>) on the texture of “Torta del Casar” cheese.....	231
IV.3.2. Proteolysis effect of <i>Cynara cardunculus</i> rennet from different plant selected for being used in the elaboration of “Torta del Casar” cheese.....	259
IV.3.3. Role of autochthonous microorganisms on the texture characteristics of the traditional cheese “Torta del Casar”.....	297
V. DISCUSIÓN.....	327
V.1. Caracterizar los cardos silvestres recolectados en la región extremeña para la elaboración de la “Torta del Casar”.....	329
V.1.1. Caracterización morfológica	329
V.1.2. Caracterización genética.....	330
V.1.3. Caracterización fenotípica	332
V.1.4. Caracterización tecnológica.....	335
V.2. Evaluar la influencia que los diferentes años y estadios de maduración en la recolección del cardo ejercen sobre las características sensoriales de las tortas.	339

Índice

V.3. Estudiar las modificaciones en las características físico – químicas, microbiológicas y sensoriales que la utilización de los diferentes cardos recolectados generan en las tortas elaboradas.....	344
V.3.1. Influencia de las propiedades tecnológicas del cuajo en la textura del queso Torta del Casar.....	344
V.3.2. Influencia de las propiedades tecnológicas del cuajo en la proteólisis del queso “Torta del Casar”.....	349
V.3.3. Influencia de los microorganismos en las características de la textura del queso “Torta del Casar”.....	356
V.4. Ceder a la DOP “Torta del Casar” el cardo más adecuado para la obtención de las mejores tortas.	359
VI. CONCLUSIONES	361
VII. BIBLIOGRAFÍA	367
VIII. RESUMEN	401