



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los alimentos

***Cynara* como coagulante vegetal para elaboración
de quesos**

***Cynara* as a vegetable coagulant for cheese
making**

Autor/es

Nuria Alfaro Rodríguez

Director/es

Teresa Juan Esteban

Agustín Ariño Moneva

Facultad de Veterinaria

2022

ÍNDICE

Resumen	2
Abstract	3
1. Introducción	4
1.1. Coagulación de la leche para la elaboración de queso	4
1.2. Enzimas coagulantes para la elaboración de queso autorizadas en España	4
1.4. Género Cynara	6
1.5. Contexto histórico del uso de Cynara spp. como coagulante vegetal	7
2. Justificación y objetivos	8
3. Metodología	9
4. Resultados y discusión	12
4.1. Cynara como coagulante vegetal para quesos de calidad diferenciada	12
4.2. Caracterización de las proteasas de Cynara y su actividad proteolítica sobre las caseínas	13
4.2.1. Actividad enzimática sobre las caseínas	14
4.3. Descripción de la obtención de la enzima coagulante a partir de Cynara	16
4.4. Factores que influyen en las características fisicoquímicas y sensoriales del queso	17
4.4.1. Diversidad genética de Cynara cardunculus	17
4.4.2. Origen de la leche	19
4.4.3. Obtención de las proteasas del extracto de flor de cardo	20
4.4.4. Almacenamiento de flor de cardo y extractos	22
4.4.5. Condiciones de coagulación	23
4.4.6. Maduración del queso	25
4.4.7. Perfil microbiológico	26
4.5. Características fisicoquímicas y organolépticas y rendimiento quesero de los quesos obtenidos	27
4.5.1. Rendimiento quesero	30
5. Conclusiones	32
6. Conclusions	33
7. Valoración personal	34
8. Bibliografía	35

Resumen

La producción de quesos se caracteriza por la variabilidad en resultados obtenidos en función a diversos factores que se dan durante la elaboración del producto. Uno de esos factores es la enzima coagulante de la leche, entre las que se distinguen tradicionalmente enzimas de origen animal y vegetal. El uso del coagulante vegetal se da principalmente en países mediterráneos del sur de Europa y Norte de África, entre los que destacan Portugal, España y Argelia.

En España, se permite el uso de los coagulantes vegetales obtenidos a partir de las especies *Cynara cardunculus*, *Cynara humilis* y *Ficus carica*. La alcachofa, *Cynara scolymus*, también conocida como *C. cardunculus* var. *scolymus*, también se ha usado tradicionalmente y ha sido caracterizada como un buen coagulante vegetal.

La elaboración de quesos con coagulante vegetal se sigue produciendo de manera tradicional y la recolección de cardos se realiza sin tener en cuenta la diversidad genética existente entre cada planta. Esto provoca una falta de estandarización de este coagulante vegetal, que afecta directamente a las características sensoriales y texturales del producto final.

Los quesos elaborados con extracto de cardo se caracterizan por ser de pasta blanda o semiblanda, y tener cierto amargor. Se realizan principalmente con leche de cabra y oveja. España cuenta con 3 Denominaciones de Origen Protegidas de quesos elaborados con *C. cardunculus*, y en el caso de Portugal son 8.

La caracterización de la relación entre la actividad coagulante y la actividad proteolítica de las enzimas de estas plantas, junto con el ajuste de los parámetros tecnológicos del procesado, permitiría optimizar el control de las características finales del queso elaborado. En función de la planta utilizada, puede obtenerse una mayor actividad proteolítica no específica que provoque un mayor amargor en el producto final y una menor consistencia del gel. También puede obtener una mayor actividad coagulante, que se asocia con una mayor firmeza en el producto final. Diversos estudios han puesto de manifiesto la posibilidad de obtener quesos de pasta dura, utilizando como coagulante los extractos de *Cynara* spp.

Abstract

Cheese production is characterised by the variability of results obtained depending on various factors that occur during the production of the product. One of these factors is the milk coagulating enzyme, among which a distinction is traditionally made between enzymes of animal and vegetable origin. The use of vegetable coagulant occurs mainly in Mediterranean countries of southern Europe and North Africa, including Portugal, Spain and Algeria.

In Spain, the use of vegetable coagulants obtained from *Cynara cardunculus*, *Cynara humilis* and *Ficus carica* species is permitted. The artichoke, *Cynara scolymus*, also known as *C. cardunculus* var. *scolymus*, has also been traditionally used and has been characterised as a good vegetable coagulant.

Cheese making with vegetable coagulant is still produced in the traditional way and the harvesting of thistles is done without taking into account the genetic diversity between the individual plants. This leads to a lack of standardisation of this vegetable coagulant, which directly affects the sensory and textural characteristics of the final product.

Cheeses made with thistle extract are characterised by a soft or semi-soft paste and a certain bitterness. They are mainly made with goat's and sheep's milk. Spain has 3 Protected Designations of Origin for cheeses made with *C. cardunculus*, and Portugal has 8.

The characterisation of the relationship between the coagulating activity and the proteolytic activity of the enzymes of these plants, together with the adjustment of the technological parameters of the processing, would make it possible to optimise the control of the final characteristics of the cheese produced. Depending on the plant used, a higher non-specific proteolytic activity can be obtained, leading to a higher bitterness in the final product and a lower gel consistency. Higher coagulant activity can also be obtained, which is associated with a higher firmness in the final product. Several studies have shown the possibility of obtaining hard cheeses, using *Cynara* spp. extracts as a coagulant.

1. Introducción

1.1. Coagulación de la leche para la elaboración de queso

Para la obtención de queso a partir de la leche, la coagulación es un paso esencial. Se trata de la formación de un gel de caseínas de la leche que retiene grasa, agua y otros componentes solubles de la leche. La coagulación de la leche para la obtención de cualquier tipo de queso se compone de tres fases, una fase enzimática, una fase de agregación micelar y la gelificación (Ordiales, 2013).

En primer lugar, en la fase enzimática se produce la hidrólisis de la unión Phe₁₀₅-Met₁₀₆ de la K-caseína, dando lugar a una división de la proteína en para-K-caseína, la parte hidrofóbica, y caseino-macropéptido, parte hidrofílica. La mayor parte de esta parte hidrofílica se elimina con el suero (Ordiales, 2013). En esta etapa la temperatura no puede ser muy alta, porque podría producir la desnaturalización de la enzima, ni tampoco muy baja porque la actividad enzimática sería muy baja. La temperatura que suele aplicarse es de 35°C.

En la segunda fase, se produce la agregación micelar de las caseínas mediante puentes de fosfato cálcico (Ordiales, 2013). La temperatura mínima de agregación micelar de las proteínas es de 20°C siendo el límite inferior de la temperatura de esta etapa. El límite superior es la temperatura de inactivación de las proteasas, que en el caso de este coagulante vegetal es de 60-70°C, mayor que la de la quimosina. Esto es importante en algunos quesos tradicionales portugueses donde realizan la coagulación a altas temperaturas (Conceição et al., 2018).

La actividad coagulante se relaciona con la capacidad de la enzima para hidrolizar el enlace entre la fenilalanina 105 y la metionina 106 de las K-caseínas. Esta capacidad aumenta con la temperatura, la concentración enzimática y las concentraciones de calcio y disminuye con el aumento de pH. Además, la enzima coagulante de la leche también puede tener actividad proteolítica inespecífica hacia otros enlaces de las caseínas, que puede afectar a las características finales del queso (Ordiales, 2013).

1.2. Enzimas coagulantes para la elaboración de queso autorizadas en España

Según la Orden de 14 de enero de 1988 por la que se aprueba la norma general de identidad y pureza para el cuajo y otras enzimas coagulantes de leche destinados al mercado interior («BOE» núm. 17, de 20 de enero de 1988), los coagulantes de la leche son preparaciones de proteasas de origen animal, vegetal o microbiano capaces de provocar la desestabilización de la micela de caseína

con formación de un gel lácteo en las condiciones habituales de elaboración del queso. Están clasificados en:

- Cuajo, obtenido exclusivamente por la extracción de los cuajares del rumiante y que puede estar constituido de quimosina y pepsina.
- Quimosina, que es el enzima obtenido de la extracción de los cuajares del rumiante y que posteriormente ha sido purificado mediante métodos físico químicos o por fermentación a partir de un microorganismo modificado genéticamente en el que se ha incorporado el gen responsable de la síntesis de la quimosina de ternera.
- Coagulante animal, de origen de distinto animal que el rumiante y constituido por quimosina y pepsina.
- Coagulante vegetal, obtenido de las especies de cardo (*Cynara cardunculus*, *Cynara humilis*) e higuera (*Ficus carica*).
- Coagulante microbiano: producto de origen microbiano cuyo componente tiene actividad coagulante y está constituido por una o varias proteasas, procedentes de las cepas: *Endothia parasitica*, *Mucor pusillus* y *Mucor miehei*.

Éstos son los coagulantes permitidos para comercialización y uso en el comercio interior, entre los cuales no pueden realizarse mezclas.

1.3. Coagulantes vegetales

A pesar de que no estén contempladas por la legislación, otras especies vegetales tienen actividad coagulante de los lácteos, como son la ortiga, la planta galio, *Galium verum*, y otras plantas pertenecientes a las familias *Actinidiaceae*, *Asteraceae*, *Bromeliaceae*, *Caricacea*, *Apocynaceae*, *Euphorbiaceae*, *Moraceae*, *Rutaceae* o *Poaceae*. Han sido caracterizadas las proteínas de *Benincasa cerifera* (Gupta y Eskin, citado por Ordiales, 2013), *Calotropis procera* (Ibama y Griffiths; Mohamed y O'Connor, citados por Ordiales, 2013), *Dieffenbachia maculata* (Padmanabhan et al., citado en Ordiales, 2013), partes del fruto de *Solanum dobium* (Yousif et al., Tavaría et al.; citados por Ordiales, 2013) *Centaurea calcitrapa*, *Ananas comosus* (Cattaneo et al., citado por Ordiales, 2013), *Carica papaya* (Cabezas et al., citado por Ordiales, 2013), *Withania coagulans* (Singh et al., citado por Ordiales, 2013), *Centaurea calcitrapa*, *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* (Tavaría et al., citado por Ordiales, 2013).

Por lo general, los coagulantes alternativos a la quimosina muestran una mayor actividad proteolítica y una menor actividad coagulante, lo que afecta al rendimiento quesero, al contenido en proteínas y grasas del producto final y a su maduración y características sensoriales. Sin embargo, hoy en día existen varios programas de investigación con el objetivo de poder caracterizar mejor el coagulante vegetal obtenido con extracto de plantas del género *Cynara*, haciendo especial hincapié en las variedades *C. cardunculus* var. *atilis* y *C. cardunculus* var. *silvestris*, que son las que han sido mayormente utilizadas como coagulantes. El objetivo de estos estudios es poder controlar las variables de proceso para obtener quesos con las características finales deseadas. (Ordiales, 2013)

1.4. Género *Cynara*

El género *Cynara* pertenece a la familia de las *Asteraceae*, subfamilia *Carduoideae*, tribu *Cynarae* y subtribu *Carduinae* (Ordiales, 2013). Se caracterizan por ser plantas espinosas perennes y angiospermas, es decir, plantas con flores. Son plantas que alcanzan gran altura y que, por lo general, no son cultivadas sino que crecen de manera espontánea en zonas del Mediterráneo, Canarias, norte



de África, Chipre y Turquía, aunque también se consideran plantas invasoras en algunos lugares como en Australia, China o México (Conceição et al., 2018). En la figura 1 puede observarse una flor del género *Cynara*.

La especie más conocida es *Cynara cardunculus*, dentro de la cual destacan las variedades *C. cardunculus* var. *atilis* (cardo cultivado), *C. cardunculus* var. *silvestris* (cardo silvestre) y *C. cardunculus* var. *scolymus* o *C. scolymus* (alcachofa), la cual es considerada por algunos autores como una especie diferente a *Cynara cardunculus* (Conceição et al., 2018). Otra especie importante es *Cynara humilis* (cardo borriquero).

Figura 1. Flor de *Cynara*

El ciclo biológico de *Cynara cardunculus* comienza en otoño, desarrollando a final de primavera la flor y finalizando en verano con la maduración del fruto. Son plantas acostumbradas a lluvias escasas e irregulares y a temperaturas altas en verano. La planta puede alcanzar hasta los 3 metros, con una media de 7 inflorescencias (Conceição et al., 2018). Se cultiva en secano y regadío, teniendo unos rendimientos de 7.000 kg/ha y 24.000 kg/ha, respectivamente. (Japón, 1986)

Se conocen diversas utilidades de estas plantas, como la obtención de biomasa o su utilización para productos farmacéuticos. La fracción lignocelulósica de la especie *C. cardunculus* L. muestra un gran potencial como biocombustible sólido y para la producción de biogás y bioetanol, lo que supone añade un valor añadido al cultivo de *Cynara*. Sin embargo, la aplicación más destacable es su uso como coagulante vegetal de leche para la elaboración de quesos (Conceição et al., 2018; Bivar et al., 2003).

1.5. Contexto histórico del uso de *Cynara* spp. como coagulante vegetal

Hoy en día la flor de cardo es una alternativa a la utilización de cuajo animal, apta para ciertas tendencias de consumo, ya sea por motivos éticos (vegetarianismo y veganismo) o por motivos religiosos. También debido a la escasez del cuajo y a su aumento de precio (Zikiou et al., 2020). Además, este coagulante caracteriza al queso con una textura, sabor y aromas diferentes. En España, tres quesos considerados Denominación de Origen Protegida utilizan este tipo de coagulante: Torta del Casar (Cáceres), Queso de Flor de Guía (Canarias) y Queso de la Serena (Badajoz), pero también se utiliza en elaboraciones tradicionales en otras zonas de España como Aragón, Cataluña y Salamanca. En Portugal su uso está muy extendido, contando con ocho quesos DOP elaborados con coagulantes vegetales (Tovar, 2016).

La utilización de extractos vegetales como coagulantes de la leche lleva realizándose de forma tradicional durante siglos. Entre las distintas plantas que se han utilizado, destaca el género *Cynara*, concretamente el cardo, *Cynara cardunculus*, el cardo borriquero, *Cynara humilis* y la alcachofa, *Cynara scolymus*, también conocida como *Cynara cardunculus* var. *scolymus*. Se encuentran referencias del uso de estas tres especies en la Península Ibérica desde la época pre-medieval (Llorente et al., 2014).

La primera referencia al uso de la flor de cardo silvestre como coagulante vegetal aparece en el año 50 a.C. en el tratado *De Re Rustica* de Lucius Junius Columella. El origen del uso de esta enzima en la península ibérica se atribuye a la dispersión de los judíos en el territorio durante el s. II d.C. Las razones de uso se asocian a la falta de higiene en el proceso de obtención de cuajo animal o a las normas de alimentación hebreas. Durante el siglo XVI, la expulsión de los hebreos de la península ibérica produjo la desaparición de sus hábitos alimentarios, por lo que el uso del coagulante de flor de cardo para quesos pasó a utilizarse en zonas aisladas donde habitaban judíos conversos, como en los Pirineos, Extremadura, Portugal y sur de Castilla y León, y también en las Islas Canarias, que fueron repobladas con habitantes peninsulares (Tovar, 2016).

2. Justificación y objetivos

En este estudio bibliográfico se busca recoger los avances y estudios que se han realizado en relación al género *Cynara* como coagulante vegetal para la elaboración de queso. El objetivo principal es conocer sus usos actuales y determinar sus usos potenciales en la industria alimentaria. Objetivos específicos:

1. Conocer el uso de las flores de plantas de *Cynara* spp como coagulante vegetal para la elaboración de quesos en distintas regiones, con el fin de describir y comparar los diversos procesos de producción tradicionales de queso con este coagulante y las características del producto final. Conocer la aceptación sensorial de los mismos y las cualidades que percibe y reclama el consumidor.
2. Describir el proceso de la obtención de la enzima, el proceso de coagulación de la leche para obtener el queso y su actividad enzimática.
3. Conocer los factores del proceso de elaboración, desde la recolección del cardo hasta el fin de la maduración del queso, que pueden modificarse con el objetivo de obtener unas características determinadas en el producto final y que este sea más estandarizado.
4. Comparar las características físicas, químicas y organolépticas de los quesos obtenidos de los diferentes estudios, para determinar cuáles de los factores estudiados pueden ser objeto de próximos estudios.

3. Metodología

Fuentes de búsqueda

Este estudio está basado en una revisión bibliográfica, en la que se han utilizado diversos recursos para la obtención de la información que se detallan a continuación.

En primer lugar, se han consultado bases de datos y buscadores como Google Académico, que permite buscar publicaciones académicas, tesis doctorales, artículos científicos y libros. También se ha utilizado el buscador AlcorZe, que permite acceder al catálogo de la biblioteca, al Repositorio Institucional de Documentos de la Universidad de Zaragoza (Zaguan) y a publicaciones académicas externas al mismo tiempo y diferentes formatos. Otros buscadores utilizados han sido ScienceDirect a través de la Universidad de Zaragoza, y Dialnet, portal bibliográfico centrado en bibliografía científica hispana. A partir de la bibliografía de los estudios y artículos que se han ido seleccionando, se han podido encontrar otros estudios referentes al coagulante de flor de cardo. También se ha accedido a las publicaciones del repositorio del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA).

Se han consultado páginas web de organismos oficiales nacionales, tanto de España como Portugal, y autonómicos. Para la obtención de datos de comercialización y de registro de productos se ha consultado el portal web del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España (MAPA) y el área de Agricultura y Alimentación del portal web oficial de la República Portuguesa. A partir de estos portales oficiales, del Registro de indicaciones geográficas de la Unión Europea (eAmbrosia) y de Boletines Oficiales Autonómicos como el Boletín Oficial de Canarias (BOC) se ha accedido también a pliegos de condiciones de diferentes productos con Denominación de Origen Protegida, aunque también se ha accedido a ellos a través de portales oficiales autonómicos, como el portal web de la Junta de Extremadura.

La información legal se obtuvo a través del servicio de publicación en línea de textos legislativos de la Unión Europea, EUR-Lex y del Boletín Oficial del Estado (BOE).

Se han consultado portales web del ámbito de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, como portales web de industrias queseras o de elaboración de coagulantes industriales y revistas gastronómicas.

Estrategias de búsqueda y criterios de selección

La mayor parte de los estudios realizados en torno al coagulante vegetal de cardo se han publicado en la zona de la Península Ibérica, pero muchos de ellos se publican en inglés. Por lo tanto, para

facilitar la búsqueda de información, se han empleado las siguientes palabras clave en español, inglés y portugués: “*Cynara*”, “flor de cardo”, “thistle”, “cardoon flower”, “*Cynara cardunculus*”, “*Cynara humilis*”, “*Cynara scolymus*”, “coagulante de queso”, “cheese coagulant”, “coagulante vegetal”, “vegetable coagulant” “diferencias entre coagulantes”, “differences between coagulants”, “queijo”, “DOP”, “PDO” “denominación de origen”, “Torta del Casar”, “Queso de la Serena”, “Queso Flor de Guía”, “Queijo da Serra da Estrela”, “Denominação de origem”, “proteínas aspárticas”, “aspartic proteins” “proteasas”, “proteases”, “cardosinas”, “cardosins”, “ciprosinas”, “cyprosinas”.

Para la búsqueda de información legal, se ha comprobado que los textos legislativos estuvieran en vigor, consultando siempre la última modificación (derogaciones parciales, sustituciones, etc.) o consultando el último texto consolidado. Para el acceso a pliegos de condiciones para las Denominaciones de Origen Protegidas se trató de acceder a través de páginas de organismos oficiales. En cuanto a los quesos Denominación de Origen Protegida de Portugal, se ha centrado la búsqueda en el Queijo Serra da Estrela ya que es uno de los más conocidos y estudiados por líneas de estudio como la de Barracosa et al.

Al principio, la búsqueda se restringió a publicaciones de los últimos 10 años, con el fin de obtener los últimos resultados respecto al uso y estandarización de *Cynara cardunculus*. Aun así, se ha podido observar que numerosos estudios recientes basan su metodología o comparan sus resultados con estudios más antiguos, como es el caso de Veríssimo et al. (1995), lo cual es una información relevante para esta revisión.

Con las búsquedas más genéricas, con las palabras clave “*Cynara*” y “cheese”, y limitando la búsqueda a los últimos 10 años se han obtenido más de 300 resultados. Posteriormente, se ha limitado la búsqueda a aquellos artículos que tuvieran ambas palabras en el título y se han descartado los artículos de los que no se disponía del texto completo en ninguno de los portales de búsqueda especificados anteriormente. Se han consultado preferentemente los artículos ordenados por relevancia y aquellos artículos que se centraran en caracterización de quesos elaborados con *Cynara*, en su comparación con quesos elaborados con cuajo animal y en el estudio de las condiciones de procesado de dichos quesos. También se ha dado prioridad a autores que han realizado investigaciones continuadas sobre el uso de este coagulante, como Paulo Barracosa del Instituto Politécnico de Viseu (Portugal) o Elena Ordiales del Centro Tecnológico Agroalimentario Extremadura. La revisión bibliográfica finalmente se centró en alrededor de 25 estudios.

Se ha dado prioridad a la búsqueda de publicaciones científicas, pero también se ha accedido a otras fuentes como sitios web de las propias queserías o revistas gastronómicas, ya que el producto está fuertemente ligado a un proceso tradicional o artesanal en pequeñas queserías.

Para la gestión de los datos bibliográficos se ha utilizado el gestor bibliográfico de Refworks.

4. Resultados y discusión

4.1. *Cynara* como coagulante vegetal para quesos de calidad diferenciada

La flor de cardo, conocida popularmente en algunas zonas como hierba cuajo, es utilizada como coagulante de quesos sobre todo en la zona del Mediterráneo, destacando en España y Portugal. El poder coagulante de la flor de cardo se debe a que el pistilo de la flor posee proteínas aspárticas que promueven la proteólisis específica de las proteínas de la leche, produciendo su coagulación. Entre las variedades de la planta del cardo, se encuentran muchas diferencias en cuanto a la actividad coagulante y la actividad proteolítica, lo que dificulta la estandarización de este tipo de coagulante (Barracosa et al., 2021).

Generalmente, este tipo de coagulante se asocia con quesos de pasta blanda o semiblanda, incluso de textura untuosa, y con un sabor muy característico, con cierto amargor. Muchos de ellos son muy valorados por los consumidores, reconocidos como Denominación de Origen Protegida tanto en España como en Portugal.

La Torta del Casar es el queso producido en España más conocido y comercializado de las 3 DOP españolas en las que se contempla el uso de extractos de *Cynara* como coagulante. Es elaborado en la zona centro-sur de la provincia de Cáceres con leche cruda de ovejas de los troncos merino y entrefino, y su maduración es como mínimo de 60 días. Su principal característica es que tiene una consistencia blanda, con una cremosidad moderada o alta, de carácter graso y fundente. La corteza es semidura, definida y diferenciada de la pasta. Este queso supuso un 1,01% de la comercialización total de quesos DOP españoles. En cuanto a su comercialización fuera de España, supuso un 0,15% de los quesos DOP exportados a Alemania, un 0,33% de los exportados a Francia y un 0,06% de los exportados a Suiza en 2020 (MAPA, 2020).

El Queso de la Serena es otra de las DOP que utilizan *Cynara* como coagulante en España. Es un queso elaborado con leche de oveja de raza Merina, de pasta blanda a semidura. Este queso supuso un 0,17% de la comercialización total de los quesos DOP en 2020. En la comercialización en la Unión Europea destaca Francia, siendo un 0,12% de los quesos españoles que importaron a este país.

En la DOP Queso Flor de Guía y Queso de Guía se distinguen 3 variedades, Queso de Flor de Guía, Queso Media Flor de Guía y Queso de Guía. Son quesos grasos o semigrasos elaborados con leche de oveja canaria fundamentalmente, aunque también pueden mezclarse con leche de vaca canaria (hasta un 40%) o leche de cabra de razas canarias (hasta un 10%). El Queso Flor de Guía debe ser elaborado exclusivamente con cuajo vegetal obtenido de los capítulos florales secos de las

variedades *C. cardunculus var. ferocissima* y *C. scolymus*, mientras que en el Queso Media Flor de Guía debe utilizarse este coagulante en una cantidad de mínimo el 50% y en Queso de Guía puede utilizarse cuajo animal/y o vegetal. La consistencia de estos quesos depende de su periodo de maduración, se considera muy blanda en los quesos semicurados y dura en los quesos curados. Son únicamente producidos en los meses de enero a julio (BOC, 2007).

El Queijo da Serra da Estrela es producido en Portugal, siendo de los quesos DOP más consumidos de este país. Es un queso curado elaborado con leche cruda de ovejas de raza Bordaleira Serra da Estrela o de raza Churra Mondegueira, de pasta desde semiblanda hasta semidura extradura si es denominado "Velho". El coagulante se obtiene de *Cynara cardunculus*, picando entre 0,2-0,3 gramos por litro de leche de flores molidas y añadiéndolas directamente a la leche con sal. El Queijo da Serra da Estrela Velho tiene una maduración mínima de 120 días (Certificação de Produtos da Beira, Lda, 2011).

Otros quesos DOP producidos en Portugal son el Queijo de Nisa, elaborado en Alentejo con leche cruda de oveja y es de pasta semidura; Queijo da Beira Baixa, Queijo de Azeitão y Queijo Serpa. También se produce el Queijo mestiço de Tolosa considerado Indicación Geográfica Protegida (IGP). En el Queijo Rabaçal las queserías consideran que ya no se utiliza el cardo. Queijo de Évora es de pasta semidura (30 días) o dura (90 días) con leche cruda de oveja.

4.2. Caracterización de las proteasas de *Cynara* y su actividad proteolítica sobre las caseínas

La actividad proteolítica de la flor de cardo fue estudiada por primera vez por Christen y Virasoro en 1935, llegando a la conclusión de que las proteasas del cardo se encuentran en el estigma y los estilos y que la actividad proteolítica finaliza a los 70°C. Vieira de Sá y Barbosa en 1972 y Tsouli en 1974 confirmaron estos resultados (Ordiales, 2013). En el cardo se han caracterizado un total de 8 proteínas aspárticas, siendo uno de los números más altos que se han encontrado en un solo organismo (Barracosa et al., 2018).

En los pistilos de la flor del cardo (*Cynara*) podemos encontrar dos tipos de proteasas, con distintas propiedades y rendimientos enzimáticos. Diferenciamos las ciprosinas o cynarasas y las cardosinas. Ambas comparten gran parte de la estructura primaria, pero se diferencian porque las ciprosinas poseen residuos Lys₁₁-Tyr₁₃ en el dominio N-terminal (Ordiales, 2013).

Las ciprosinas son peptidasas con actividad coagulante de la leche, que se subdividen en tres tipos, siendo la tipo 3 la más similar a la quimosina animal. Tienen diferentes puntos isoeléctricos en torno a pH 4,0, y tienen mayor actividad a pH ácido (Prados, 2005).

Las cardosinas son peptidasas aspárticas activas a pH ácido. En las primeras caracterizaciones de las cardosinas de la flor de cardo, se encontraron las cardosinas A, B, C y D, pero recientemente han sido caracterizadas las cardosinas E, F, G y H, que en un principio se incluyeron en la cardosina A (Barracosa et al., 2018). Están divididas en 2 grupos en función de su actividad proteolítica, por un lado las cardosinas A, E, F, G y H y por otro las cardosinas B, C y D. La cardosina de tipo A corresponde a un 75% de la actividad enzimática de este tipo de enzimas y se encuentra principalmente en las partes superiores de las flores, acumulándose en las vacuolas estigmáticas y en las vacuolas de células de estilo epidérmico. Es más similar a la quimosina y tiene una mayor especificidad hacia la K-caseína. La cardosina B, corresponde con un 10-25% de la actividad enzimática, se asimila a la pepsina y se encuentra en la pared celular y la matriz extracelular del tejido transmisor floral a lo largo del pistilo. Tiene una mayor actividad proteolítica inespecífica. Las cardosinas E, F, G y H son similares a la cardosina A, con picos de actividad a pH 4,3. Concretamente, las cardosinas E y G tienen una actividad mayor que la cardosina A, mientras que la cardosina E tiene mayor especificidad que ésta (Ordiales, 2013; Folgado et al., 2020; Zikiou et al., 2020).

En *Cynara cardunculus*, la cardosina A se localiza principalmente en la parte superior de los pistilos, y la cardosina B en la parte inferior (Prados, 2005). En el caso de *Cynara humilis*, el extracto enzimático que se obtiene sólo contiene cardosina A, lo que diferencia la actividad coagulante entre ésta y *Cynara cardunculus* (Ordiales, 2013; Prado, 2005).

4.2.1. Actividad enzimática sobre las caseínas

La leche contiene alrededor de un 3,5% de proteínas, entre las que destacan dos grandes grupos, las caseínas (80% de la proteína total) y las proteínas del lactosuero (19%). En la elaboración del queso, gran parte de las proteínas del lactosuero se pierden con el suero, por lo que las que permanecen en el queso son principalmente las caseínas, debido a que son muy hidrofóbicas. En este grupo diferenciamos α_{s1} -caseína, α_{s2} -caseína, β -caseína y K-caseína. Las caseínas se encuentran naturalmente en la leche formando las micelas de caseína, en las que las α_s - y β -caseínas están en la parte interior de las submicelas unidas por puentes de fosfato cálcico, mientras que en el exterior de la micela se encuentra la K-caseína. La carga de las micelas es negativa, lo que las mantiene en suspensión (Prados, 2005).

Las cardosinas tienen preferencia por determinados enlaces hidrofóbicos como el enlace Ala₁₆₃-Try₁₉₃ de la α ₁-caseína bovina y el enlace Ala₁₈₉-Tyr₁₉₃ de la β -caseína (Ordiales, 2013). Por lo tanto, una de las diferencias que se observan entre las cardosinas A y B y la quimosina del cuajo es la hidrólisis de α _s- y β -caseínas en las primeras fases de la coagulación, cuando la quimosina únicamente hidroliza la K-caseína. Esto contribuye a cambios en la textura del queso, otorgándole mayor suavidad final. También son capaces de hidrolizar al menos una de las γ -caseínas (fragmentos de β -caseínas) y tienen mayor afinidad a la K-caseína que otras enzimas coagulantes (Barracosa et al., 2021). Vairo et al. (2013) estudiaron la diferente actividad proteolítica de las cardosinas en función de la especie de origen de la leche, como podemos observar en la Tabla 1.

Tabla 1. Actividad proteolítica de las cardosinas sobre las caseínas bovinas, caprinas y ovinas. Vairo et al., 2013.

Enzimas	Caseínas bovinas		
	α ₁ -caseína	β -caseína	K-caseína
Cardosina A	Phe ₂₃ -Phe ₂₄ ; Phe ₁₅₃ -Try ₁₅₄ ; Trp ₁₆₅ -Tyr ₁₆₆	Leu ₂₇ -Thr ₁₂₈ ; Leu ₁₆₅ -Ser ₁₆₆ ; Leu ₁₉₂ -Try ₁₉₃	Phe ₁₀₅ -Met ₁₀₆
Cardosina B	Phe ₂₃ -Phe ₂₄ ; Phe ₁₅₀ -Arg ₁₅₁ ; Phe ₁₅₃ -Try ₁₅₄ ; Trp ₁₆₄ -Tyr ₁₆₅	Leu ₁₆₅ -Ser ₁₆₆ ; Leu ₁₉₂ -Try ₁₉₃	Phe ₁₀₅ -Met ₁₀₆
	Caseínas caprinas		
Cardosinas A y B	Phe ₁₅₃ -Tyr ₁₅₄	Leu ₁₂₇ -Thr ₁₂₈ ; Leu ₁₉₀ -Tyr ₁₉₁	Lys ₁₁₆ -Thr ₁₁₇
	Caseínas ovinas		
Cardosina B	Leu ₁₅₆ -Asp ₁₅₇ ;	Leu ₁₂₇ -Thr ₁₂₈ ;	Phe ₁₀₅ -Met ₁₀₆

	Trp ₁₆₄ -Tyr ₁₆₅	Leu ₁₆₅ -Ser ₁₆₆ ; Leu ₁₉₀ -Tyr ₁₉₁	
--	--	--	--

Por otro lado, la cipsosina 3 ha demostrado tener una mayor actividad coagulante con leche de oveja que la quimosina y una hidrólisis más específica. La cipsosina 1 tiene la actividad específica más baja (Vairo et al., 2013).

Las cipsosinas hidrolizan el enlace Phe₁₀₅-Met₁₀₆ de la κ -caseína, pero también hidrolizan zonas voluminosas e hidrofóbicas de la α_{s1} -caseína en los enlaces del segmento Ala₁₆₃-Val₁₆₇, las regiones Phe₈₈-Try₈₉ y Try₉₅-Leu₉₆ de la α_{s2} -caseína y la unión Ala₁₈₉-Tyr₁₉₀ de las β -caseínas liberando péptidos amargos. Además, para las mismas condiciones de pH las cipsosinas tienen mayor intensidad sobre las caseínas de cabra que sobre las de oveja. Una concentración de alrededor del 5% de cloruro sódico produce una disminución de la actividad proteolítica sobre las caseínas α y β (Prados, 2005).

4.3. Descripción de la obtención de la enzima coagulante a partir de *Cynara*

La recolección de la flor de cardo se realiza durante la primavera o comienzo del verano, cuando el pistilo está más maduro, y la actividad enzimática es mayor. Se suele realizar en los meses de junio a agosto, y se almacenan en lugares secos, tratando de evitar la proliferación de hongos para poder usarlos después en los meses de invierno, durante los periodos de lactación.

Tradicionalmente, en quesos como la Torta del Casar la obtención del cuajo se realiza con una maceración en agua de la flor del cardo, obteniéndose un cuajo líquido que se añade directamente a la leche, como se especifica en su pliego de condiciones. En el cuaderno de especificaciones del Queijo da Serra da Estrela (Portugal) se describe cómo se utilizan entre 0,2-0,3 g de flor de cardo para la preparación del macerado por cada litro de leche.

Hay diversos estudios respecto a la obtención de este coagulante vegetal para una posible estandarización y comercialización, entre los que destaca el realizado por Veríssimo et al. en 1995. Hoy en día, la técnica de purificación en dos pasos realizada en este estudio es la más utilizada en estudios actuales, aunque con pequeñas variaciones. La purificación en dos pasos consiste en una extracción a pH ácido, exclusión molecular y cromatografía de intercambio aniónico por FPLC (Veríssimo et al, 1995; Ordiales, 2013).

García et al. (2011) realizaron la extracción mediante una disolución de 10 g de flores en 90 ml de agua destilada durante 30 minutos. Después se filtró y centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos y se filtró de nuevo con papel de filtro. Posteriormente realizaron una comparación de la actividad

coagulante de las enzimas obtenidas frente a la actividad de coagulante animal y coagulante microbiano. Obtuvieron que la actividad de las enzimas obtenidas a partir del cardo fue mucho más baja que las demás, lo que podría deberse al método de obtención, en el que se realiza una dilución del 90%.

Se ha comprobado que el método de obtención de la enzima es un factor determinante en la actividad coagulante del extracto, influyendo la concentración de extracto de la maceración y la cantidad de esta dilución que se añade después a la leche. También pueden influir otros factores como la incubación previa en las condiciones de la coagulación o el tiempo de maceración (Ordiales, 2013).

Hoy en día existen coagulantes vegetales comerciales líquidos obtenidos a partir de *Cynara cardunculus*, como el producido por la empresa Abiasa. También se han realizado algunas patentes de coagulante vegetal a partir de cardo en polvo y, al igual que la quimosina recombinante, se han realizado estudios sobre una posible cipsosina recombinante (Prados, 2005). El uso de este tipo de coagulantes permitiría reducir la variabilidad que genera este factor a los quesos, sujeta a niveles de concentración de los extractos, condiciones de secado y almacenamiento, microorganismos presentes en el cardo o concentraciones añadidas a la leche.

4.4. Factores que influyen en las características fisicoquímicas y sensoriales del queso

Con el objetivo de estandarizar los quesos elaborados con el coagulante de cardo, numerosos autores han estudiado los factores que son determinantes en las características finales del producto. Para ello, han tratado de determinar la relación de la actividad coagulante y la actividad proteolítica de los extractos y por qué factores se ven afectadas, así como optimizar el rendimiento del extracto.

4.4.1. Diversidad genética de *Cynara cardunculus*

Las dos variedades de *Cynara* más utilizadas para la elaboración de quesos son el cardo salvaje (*var. sylvestris*) y el cardo cultivado (*var. altilis*), aunque también se utilizan *C. humilis* y *C. scolymus*. Dentro de las propias variedades existe una gran diversidad genética, y ninguna de ellas tiene un perfil estandarizado. Habitualmente, el coagulante obtenido en las queserías procede de plantas que crecen en los márgenes de huertas u otras plantaciones, cunetas y otras localizaciones no específicas (Ordiales, 2013). Aun así, en 1986 en España ya se cultivaban unas 1350 hectáreas de cardo, sobre todo en las zonas del Ebro, Levante y Andalucía (Japón, 1986).

Las diferencias obtenidas en los quesos por la gran diversidad bioquímica existente entre los cardos utilizados para la elaboración de queso fue investigada por Barracosa et al. en 2021, en un estudio realizado en Portugal. Para ello, seleccionaron 6 plantas de cardo (*C. cardunculus*) con distintos perfiles bioquímicos en la comarca da Serra da Estrela (1M, 2M, 3M, 4M, 5M, 6M), y las cultivaron. Todas ellas eran pertenecientes a la variedad de cardo cultivado (*C. cardunculus* var. *atilis*) excepto 2M, perteneciente a la variedad de cardo salvaje (*C. cardunculus* var. *sylvestris*).

En primer lugar, caracterizaron las cardosinas de las 6 plantas de cardo mediante electroforesis y análisis cromatográfico y las correlacionaron con su actividad coagulante y actividad proteolítica. Pudieron observar que las plantas 4M, 5M y 6M tenían una mayor cantidad de cardosina A. Estos extractos se consideran mejores para la elaboración del queso en cuanto a rendimiento, dada la alta especificidad para hidrolizar el enlace entre la fenilalanina 105 y la metionina 106 de las K-caseínas y por tener menor actividad proteolítica inespecífica. Por otro lado, las plantas 1M, 2M y 3M presentaron una menor especificidad ante el enlace Phe105-Met106 de la K-caseína y una mayor actividad proteolítica inespecífica, lo que favoreció consistencias de gel más bajas.

En los ensayos que se llevaron a cabo respecto a la acción proteolítica con diferentes caseínas (α_{s1} , α_{s2} , β - y K-caseína) observaron en todos ellos que la planta de cardo silvestre tenía mayor actividad proteolítica entre los 15 y 30 minutos, pero tras los 30 minutos, su actividad proteolítica con la K-caseína descendía por debajo de la actividad de las otras plantas.

También estudiaron cómo este aspecto afectaba a la coagulación y al tiempo de inicio de la floculación. Para ello, añadieron a 1 mL de leche descremada 2900 ng de una solución de cardosinas totales de cada planta (1M, 2M, 3M, 4M, 5M, 6M) obtenidas por cromatografía de exclusión molecular. Analizaron el tiempo de coagulación, la firmeza de la cuajada multiplicando 2 y 3 veces el tiempo de coagulación y la tasa de agregación micelar. La diferencia más significativa fue que la planta 6M presentó la actividad coagulante más alta, ya que comenzó más rápido la fase de agregación micelar. Las plantas con menores actividades coagulantes fueron 4M y 5M.

También tomaron los datos de firmeza tras 20, 40 y 60 minutos después de la adición del coagulante, cuyos resultados pueden observarse en la Figura 2. Pudieron comprobar que la tasa de agregación micelar influenció a la firmeza durante los 60 minutos y que la actividad coagulante también se vio afectada por los diferentes perfiles bioquímicos. Al inicio, todos los extractos produjeron una firmeza similar, pero pasados los 60 minutos, las cuajadas elaboradas con extractos de las plantas con menor cardosina A (1M, 2M y 3M) mostraron una firmeza menor, sobre todo la elaborada con el extracto de la planta 3M.

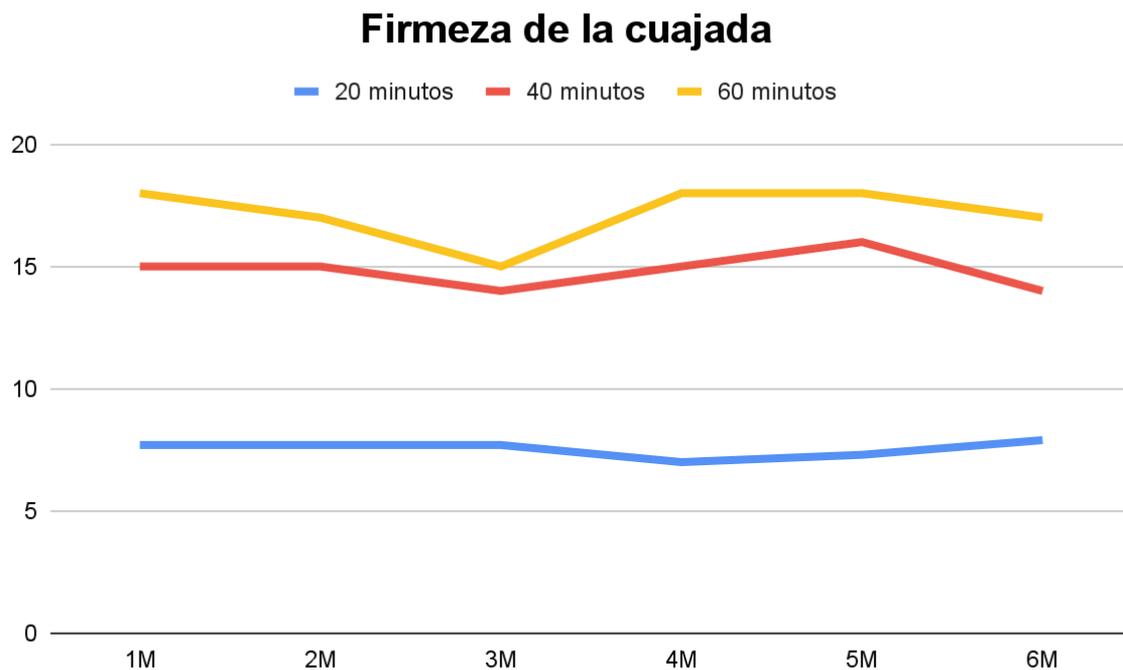


Figura 2. Gráfico realizado a partir de los datos obtenidos de *Biochemical diversity of cardoon flowers (Cynara cardunculus L.): Predicting PDO Mediterranean cheese textures*, Barracosa et al., (2021)

Posteriormente, realizaron estudios sobre la influencia de la diversidad bioquímica de las plantas en la etapa de maduración de los quesos, como se detalla más adelante.

4.4.2. Origen de la leche

En Extremadura, la Torta del Casar y el Queso de la Serena se elaboran con leche de oveja y en Canarias los quesos de Flor de Guía están elaborados con leche de cabra. El queso de Flor de Guía también puede estar elaborado con mezcla de leche de cabra, oveja y vaca. Cuando se coagula la leche de vaca con proteasas obtenidas de la flor de cardo se obtienen quesos con cierto sabor amargo, debido a los valores menores de nitrógeno soluble y un mayor porcentaje de caseína residual. En cambio, los quesos elaborados con leche de cabra y oveja tienen un sabor menos amargo y más agradable (García, et al., 2011). Esto también podría deberse a una mayor especificidad del cuajo por la leche de oveja y cabra.

Benheddi y Hellal (2019) estudiaron las variaciones en un queso fresco tradicional argelino coagulado con extracto de flores de cardo. Este queso se realiza con leche cruda de oveja, cabra y vaca, pero en este caso realizaron los quesos con leche pasteurizada de vaca y cabra y con un cultivo iniciador de bacterias ácido-lácticas. Observaron que hasta un tercio de la variabilidad obtenida en los

parámetros de los quesos era debida al origen de la leche, siendo los quesos de cabra más apreciados por el consumidor y más compactos y homogéneos. Los quesos de vaca tuvieron menor preferencia y mayor fluidez y presencia de suero. Se concluyó con este estudio, que el rendimiento quesero con la leche de cabra fue mayor.

Pereira et al. (2011) también concluyeron que el origen de la leche afectaba sobre todo a la estructura en quesos elaborados con extractos de *Cynara*, ya que en la leche de vaca se observó un mayor debilitamiento de la matriz de caseínas. Además, los quesos de cabra destacaron en el aroma bouquet al final de la maduración mientras que los quesos de oveja y vaca destacaron en el desarrollo de nuevos sabores. Obtuvieron una mejor textura los quesos de oveja, después los de cabra y por último los de vaca.

También se ha estudiado el uso de coagulante a partir del extracto de cardo para la elaboración de quesos con leche de vaca como son el Bel Paese, Grana, Gruyere y Provolone. Los resultados de Bel Paese en cuanto a textura fueron buenos, ya que se trata de un queso de pasta blanda, pero el sabor fue diferente al coagulado con cuajo. El queso Gruyere tenía un sabor amargo y una textura completamente diferente a la habitual y los quesos Grana y Provolone presentaban pérdida de forma y textura más suave (Bivar et al., 2003).

La elaboración de quesos con coagulante vegetal, por lo general, se asocia al uso de leche cruda. Este es un factor importante que puede dificultar la estandarización, sobre todo por la carga microbiana que aporte la leche, que afectará después a la etapa de maduración y a las características finales del producto. Podrían obtenerse quesos más estandarizados utilizando leche tratada térmicamente y utilizando cultivos iniciadores (Pereira et al., 2011). También se ha comprobado que puede influir el periodo de lactación, y que es un factor que puede tener interacción con el tipo de coagulante, afectando a características como la cohesión de la corteza o al contenido de grasa. El momento de producción en el que se aprecian quesos más homogéneos es en febrero, punto medio de la temporada de ordeño en ovino (Fogeiro et al., 2020).

4.4.3. Obtención de las proteasas del extracto de flor de cardo

Las flores de *Cynara* spp. se recolectan habitualmente realizando un corte de flores maduras y abiertas. Empíricamente, se tienden a recoger cuando más azul-púrpura es la flor, ya que se entiende que es el momento de mayor actividad coagulante. Un futuro objetivo es implantar la recolección mecánica de las flores, pero todavía no se ha desarrollado ningún dispositivo específico para ello (Conceição et al., 2018).

Ordiales (2013) estudió la influencia de la concentración del extracto de enzimas (gramos de flores secas y picadas por 100 mililitros de agua) y el tiempo de maceración como determinantes sobre la actividad coagulante, el perfil proteico y su actividad sobre las caseínas. Observó que los extractos con mayor concentración presentaban mayor actividad coagulante y a través de una electroforesis con gel de poliacrilamida comprobó que tenían un perfil proteico con bandas de actividad más intensas y degradan las caseínas con mayor intensidad.

El tiempo de maceración lo estudió con dos plantas diferentes a diferentes concentraciones y diferentes tiempos de maceración. Las concentraciones seleccionadas fueron 0,65 g/100 ml, 5 g/100 ml y 10 g/100 ml, y los tiempos fueron 1 h, 2 h, 4 h y 16 h. Las muestras con la mayor actividad proteolítica fueron la muestra con la concentración 10 g/100 ml tras 1 h de maceración y la muestra con concentración 10 g/100 ml durante 4 h de maceración. Después, aplicó una electroforesis con gel de poliacrilamida para estudiar la actividad coagulante. Con los resultados obtenidos concluyó que tiene más influencia la concentración del extracto que el tiempo de maceración, aspecto en el que no encontró diferencias significativas. Por último, estudió cómo afectan estos 2 factores (concentración y tiempo de maceración) en la actividad coagulante directamente en la leche. Para ello elaboró extractos con diferentes concentraciones y diferentes tiempos de maceración, obteniendo mayores actividades coagulantes a mayor concentración de cardo, y solo en un caso se obtuvo diferencias significativas entre los diferentes tiempos de maceración.

También estudió la influencia del uso de flores en tres estados diferentes de maduración. En primer lugar, cuando las flores se estaban abriendo y solo algunos estigmas y estilos eran visibles; en segundo, cuando las flores estaban totalmente abiertas y, por último, cuando las flores empezaban a secarse y los estilos y los estigmas eran de color marrón. Tras la elaboración de los quesos siguiendo el método descrito para Torta del Casar, no obtuvo ninguna diferencia significativa en cuanto a este factor. Tampoco las encontró entre las plantas recolectadas en 3 años diferentes o en las diferentes localizaciones de la zona de Extremadura. Por lo tanto, en este estudio concluyó que los diferentes años de recolección, el estado de maduración de la flor y el lugar del que son recogidas no son factores influyentes sobre la actividad coagulante de los extractos y las características del queso. En cambio, sí lo son el tiempo de maceración y la concentración del extracto de flor, siendo este último el más determinante.

4.4.4. Almacenamiento de flor de cardo y extractos

El método tradicional de almacenamiento de la flor de cardo es la deshidratación a temperatura ambiente (25-30°C) durante 30-60 días, evitando la luz solar y fermentaciones o proliferación de hongos.

Conceição et al. (2018) señalan que durante el almacenamiento se produce una estandarización de la actividad coagulante. Se estima que las pérdidas sobre la actividad enzimática del cardo debidas al método tradicional de almacenamiento son aproximadamente del 75% del coagulante enzimático potencial en la flor expresado en unidad de materia seca o pérdidas de entre el 20 y 50% en la actividad de coagulación de la leche expresada en base seca o en base de nitrógeno total.

Martins et al. (1999) estudiaron cómo reducir estas pérdidas cambiando las condiciones de secado. Para ello realizaron un ensayo con 3 métodos de secado diferentes al tradicional (25-30°C durante 30 días). El que mejores resultados obtuvo fue un secado a 25-30°C durante 7 días, incrementándose aproximadamente un 35% el promedio de actividad proteolítica sobre base seca respecto a las flores secadas tradicionalmente. Realizando un secado de 55°C durante 5 días se incrementó este promedio en un 17%. Sin embargo, en el secado a 100°C durante 5 horas se produjo una reducción del 5% del promedio de actividad proteolítica.

Para comprobar que el método de secado a 25-30°C durante 7 días fuese seguro, comprobaron la humedad de estas flores obteniendo un valor de 6% (p/p), similar a las flores secadas tradicionalmente que tenían un promedio de 0,585 en actividad de agua. Concluyeron por lo tanto que, controlando las condiciones de secado y la humedad relativa de almacenamiento a temperatura ambiente, se pueden reducir las pérdidas del secado tradicional. Sin embargo, siempre se producen algunas pérdidas en la actividad proteolítica durante el almacenamiento. Encontraron pérdidas de en torno al 35% del promedio de actividad proteolítica original en flores almacenadas a 25°C durante 300 días y en flores almacenadas a 4°C durante 100 días.

Ordiales (2013) estudió cómo afectaba a la actividad coagulante el almacenamiento de los extractos de *Cynara* en refrigeración. Observaron que tras 1 semana no había disminuido la actividad coagulante y que incluso podría haber incrementado ligeramente. Tavaría et al. (2001) observaron que tras una semana de almacenamiento a 4°C aumentaba la actividad proteolítica sobre α - y β -caseína, pero entre la primera y segunda semana comenzaba a disminuir. La actividad coagulante se redujo en un 22% en la segunda semana y un 65% tras 4 semanas.

4.4.5. Condiciones de coagulación

Las condiciones de coagulación, como la cantidad y calidad de cuajo, la temperatura o el tiempo de cuajado, determinan las características de la pasta obtenida. Por lo general, las condiciones de coagulación de los quesos son a una temperatura de entre 25 y 32°C durante diferentes intervalos de tiempo en función del queso que se quiere obtener. En la Torta del Casar se establece entre 50-90 minutos a 26-32°C y en el Queso de la Serena entre 50-75 minutos a 25-32°C. En el Queso de Flor de Guía se utilizan temperaturas más elevadas, de entre 28-38°C dependiendo de la modalidad que se realice. Además, normalmente en esta etapa se realiza el salado, a veces se añade directamente con el coagulante o se realizan salazones controlando las condiciones higiénicas.

El óptimo de coagulación es muy variable en función de las condiciones de procesado y del queso que se quiera obtener. Por ejemplo, Zikiuo y Zidoune (2019) encontraron el óptimo a pH 5, temperatura de 60°C y concentración de CaCl₂ de 0,02M para la elaboración de queso Camembert con coagulante vegetal.

Concentración de extracto

Como se ha comentado anteriormente, la concentración del extracto de flor de cardo es un factor determinante en la actividad coagulante, aumentando ésta cuando lo hace la concentración. Sin embargo, una excesiva cantidad de este tipo de coagulante puede producir amargor en el queso, ya que también puede aumentar la actividad proteolítica no específica (Ordiales., 2013). También podría aumentar la actividad proteolítica si se realiza una coagulación lenta y prolongada, pudiendo afectar posteriormente a la etapa de maduración del queso (Gomes et al., 2019). Por lo tanto, el control de la cantidad de coagulante y de la duración de la etapa de coagulación es un factor determinante.

Para controlar el exceso de la actividad proteolítica en quesos gouda con leche bovina, Llorente et al. (2014) realizaron ensayos de coagulación con extractos de proteasas de flores secas de *Cynara scolymus* y cuajo bovino. El extracto vegetal de alcachofa se elaboró en una concentración de 0,33 gramos por mililitro de tampón de fosfato de potasio. Las concentraciones de coagulantes fueron 30 mililitros de extracto vegetal de alcachofa por 10 litros de leche y 0,6 mililitros de cuajo bovino por 10 litros de leche. Compararon la aplicación de salmueras de 30 y 40 h de duración a las cuajadas. Además de obtener tiempos de coagulación óptimos para su aplicación a nivel industrial y sustituir el cuajo animal, observaron que la aplicación de la salmuera de 40 h disminuía la proteólisis no específica y por lo tanto la producción de sabores amargos.

Temperatura

La temperatura es un factor importante para la coagulación, ya que en la leche refrigerada, las micelas de caseína tienen una gran estabilidad. Se debe a una reducción del tamaño de las micelas, a la disminución del fosfato cálcico coloidal y a un aumento de la repulsión estérica entre micelas. Por otro lado, si se dan temperaturas muy altas se produce la desnaturalización de las enzimas.

Alves (2003) observó mediante el Optigraph que la fase de agregación micelar de la primera etapa de la coagulación se veía más afectada por la temperatura que por el tipo de coagulante, aumentando conforme lo hacía la temperatura. Este efecto fue más notorio en la leche de vaca que en la leche de oveja, y con el coagulante de cardo que con el de cuajo. Llegó a la conclusión de que por debajo de 30°C la coagulación no se veía tecnológicamente beneficiada. Del mismo modo, Zikiou y Zidoune (2019) obtuvieron picos de la actividad coagulante a 60°C, mientras que a temperaturas más elevadas comenzaba la desnaturalización de la enzima. En el caso del cuajo animal, este pico de actividad se dio a los 40°C, y a 60°C la actividad coagulante desaparecía.

pH

El pH de la leche es un factor importante en la etapa de coagulación, ya que acelera la acción enzimática y la agregación micelar debido a que el punto isoeléctrico de las caseínas es de 4,6. Los iones H^+ desplazan los iones Ca^{2+} de los puentes de fosfato cálcico y se libera calcio iónico al lactosuero y se produce la neutralización de las cargas negativas. También tiene una gran influencia en la actividad proteolítica, ya que las proteasas tienen mayor actividad a pH ácido. Aun así, la cuajada puede ser sensible a la bajada del pH, en la leche de cabra a un pH inicial de 6,3-6,4 la cuajada puede romperse (Conceição et al., 2018). El pH habitual de la leche es de 6,5, mientras que el necesario para el inicio de la coagulación se encuentra entre 5,1-5,3 (Llorente et al., 2014).

En lo que respecta al coagulante, el cuajo animal es más sensible al aumento del pH, en cambio el extracto de cardo, también en la variedad *C. humilis*, es más estable en todos los rangos de pH utilizados, sobre todo en el caso de la leche de oveja, con la que se suele trabajar en rangos de 6,7-6,8. El aumento de la actividad coagulante por la bajada del pH en la leche de vaca es más notorio con cuajo que con coagulante vegetal. En leche de oveja, este aumento de la actividad coagulante es más notorio con el coagulante vegetal (Conceição et al., 2018). Los máximos de actividad coagulante encontrados por Zikiou y Zidoune (2019) fueron para ambos coagulantes en torno a pH 5. Conforme el pH aumentaba, la actividad coagulante disminuía hasta desaparecer a pH 7.

Adición de cloruro cálcico

La adición de cloruro cálcico es otro de los factores que condicionan la etapa de coagulación, debido a la presencia de iones de calcio. En la segunda etapa es cuando afecta directamente, ya que el Ca^{2+} se combina con la paracaseína formando micelas, y, por lo tanto, favoreciendo la coagulación. La proporción de esta forma iónica depende del pH de la leche. Se añade cloruro cálcico a la leche ya que puede no aportar las suficientes cantidades, lo cual es menos común en pequeños rumiantes. (Conceição et al., 2018) En la elaboración del queso Azeitão se añaden entre 15-25 g NaCl por litro de leche. La adición de esta cantidad tiene un claro efecto en el cuajo, pero no afecta en gran medida al coagulante vegetal. En cuanto al tipo de leche, las leches de cabra y vaca son más sensibles a la adición de sal, siendo la de oveja más estable, aportando mayor firmeza al gel.

Alves (2003) concluyó que la firmeza del gel aumentaba con la adición de calcio en leche de vaca con el extracto de cardo, aunque este efecto era menor comparado con el cuajo animal, lo que podría atribuirse a la mayor actividad proteolítica no específica de las enzimas del extracto de flor de cardo. Tanto en el cuajo como el extracto de cardo, este efecto dejó de apreciarse a concentraciones mayores del 0,06% de cloruro cálcico añadido. Sin embargo, Zikiou y Zidoune (2019) observaron que, tanto para el extracto de cardo como para el cuajo animal, la actividad coagulante aumentaba hasta concentraciones de cloruro cálcico de 0,02 M y bajaba cuando superaba esa concentración.

Otros factores

Por último, Silva y Malcata (2005), estudiaron cómo afectaba la incubación en condiciones de maduración de las cardosinas A y B antes de añadirla a la leche. Estas condiciones condicionan la estabilidad y actividad de las enzimas. Comprobaron que tenía un efecto positivo, aumentando su actividad sobre las caseínas ovina y caprina.

4.4.6. Maduración del queso

Tradicionalmente, las condiciones óptimas para la elaboración de los quesos elaborados con coagulante vegetal como la Torta del Casar se producían durante el otoño. Hoy en día, al poder controlar la temperatura y humedad relativa durante su maduración, se elaboran de forma continuada.

Durante el proceso general de maduración del queso se producen tres fenómenos, glucólisis, lipólisis y proteólisis. Otros fenómenos como la oxidación de los lípidos no suelen ser relevantes en los quesos debido a la presencia de antioxidantes naturales o el bajo potencial redox (Ordiales, 2013).

La proteólisis es la que más afecta al producto final, ya que las proteínas dan lugar a péptidos cortos, aminoácidos y compuestos volátiles. El paso de caseínas a péptidos cortos es llevado a cabo por

proteasas endógenas a la leche y por el coagulante residual y afectará a la textura del queso. El coagulante residual sobre todo afecta al principio de la maduración junto con las proteasas externas a la leche, en el paso de caseínas a péptidos intermedios, lo que afecta a la textura. Puede tener acción específica en las α_1 -, α_2 -, β - caseínas y para-k-caseína. El paso de péptidos intermedios a cortos también afecta a la textura, pero se lleva a cabo principalmente por proteasas de bacterias ácido-lácticas y otros cultivos. El paso de péptidos cortos a aminoácidos afecta principalmente al sabor y también es llevado a cabo principalmente por bacterias ácido-lácticas. Por último, la generación de compuestos volátiles a partir de aminoácidos libres afecta al sabor y al aroma (Ordiales, 2013; Feijoo et al., 2018).

En el caso de la lipólisis (producción de ácidos grasos libres, mono y diglicéridos y glicerol), el coagulante a partir de cardo mejora este aspecto, por lo que la actividad lipolítica es baja. En un estudio realizado por Sanjuán et al en 2002 observaron que los quesos elaborados con este coagulante poseían más grasa, lo que puede deberse a que este coagulante tiene mayor capacidad para capturar las grasas de la cuajada (Ordiales, 2013; Feijoo et al., 2018). Estos resultados concuerdan con los estudios realizados por Nuñez et al. en Quesos de la Serena, Tejada en quesos de Los Pedroches y Vioque, citados por Prados (2005), encontrando todos ellos mayor porcentaje de grasa en los quesos elaborados con extractos de *Cynara* que en los quesos elaborados con cuajo. Aun así, las variaciones de grasa también pueden verse afectadas por el proceso de elaboración y por la variedad de composición de la leche inicial (Prados, 2005).

4.4.7. Perfil microbiológico

Los microorganismos presentes en el queso, tanto aquellos aportados por la leche como aquellos aportados por el coagulante, desarrollan parte de la proteólisis que forma parte de la elaboración del queso y determina sus características finales. Principalmente, los microorganismos realizan la proteólisis secundaria, que se produce durante la maduración del queso, produciendo aminoácidos libres y favoreciendo la interacción de las proteínas con el agua, lo que influye en el sabor, olor y parámetros físicos del queso (Ordiales, 2013).

Ordiales (2013) estudió la procedencia de los microorganismos en los quesos de la Torta del Casar, pudiendo observar que los microorganismos procedentes del coagulante vegetal eran principalmente enterobacterias y coliformes. Por otro lado, los microorganismos observados procedentes de la leche fueron bacterias ácido-lácticas, lactococos, enterococos, estafilococos, micrococos y mohos y levaduras.

Los microorganismos procedentes de la leche cruda favorecieron la generación de olores y sabores por la liberación de aminoácidos libres y péptidos, así como el proceso de maduración. Estudió la influencia de los microorganismos en las características de textura del queso. Obtuvo una correlación negativa en cuanto a la dureza y la cohesividad y los microorganismos aportados por el coagulante vegetal, enterobacterias y coliformes. Produjeron una falta de firmeza en el queso al final de la maduración (60 días). Concluyó que los microorganismos presentes en las materias primas, entre ellas el coagulante, tienen una gran influencia en el producto final y que, por lo tanto, para controlar este proceso, sería importante la aplicación de un cultivo iniciador.

4.5. Características fisicoquímicas y organolépticas y rendimiento quesero de los quesos obtenidos

Los quesos coagulados con enzimas de flor de cardo suelen ser quesos de pasta blanda o untuosa, pero también se pueden elaborar quesos de pasta dura. En la comarca del Maestrazgo, en Teruel, se realizaban este tipo de quesos para consumo familiar (Mallor, 2018).

Como se ha comentado en apartados anteriores, en función de diversos factores se pueden obtener quesos a partir de extracto de *Cynara*, con características sensoriales y fisicoquímicas diversas. Algunos de los estudios que se contemplan en este apartado comparan los resultados entre el uso de cuajo animal y el uso de cardo, y otros los resultados obtenidos de la producción de quesos únicamente con coagulante vegetal, pero variando las condiciones de procesado de los mismos.

Comparación entre quesos elaborados con diferentes extractos de *Cynara spp*

Para comprobar la influencia de la variabilidad genética del cardo sobre las características de los quesos, Fogueiro et al. (2020) elaboraron quesos Serra da Estrela con un mismo lote de leche y en la misma quesería para reducir otros factores de influencia. Los realizaron con un coagulante comercial de flor de cardo utilizado habitualmente para este tipo de queso, y otros 2 coagulantes obtenidos a partir de dos flores de cardo (3M, 6M). Pudieron comprobar que el tipo de coagulante tenía influencia en el color de la pasta y la corteza en quesos madurados durante 38 días. Los resultados que obtuvieron fueron que los quesos realizados con coagulante comercial tuvieron un color más amarillo, lo cual fue perceptible por los consumidores. En cuanto al color de la pasta, el queso realizado con el extracto de la planta 6M tuvo el color más neutro. Por otro lado, también encontraron influencia del tipo de coagulante vegetal en la concentración final de grasa y proteína. El queso con mayor contenido en proteína fue el elaborado con la planta 3M y el queso con más grasa el elaborado con el extracto de la planta 6M.

Otra variable en la que puede influir el tipo de coagulante es la textura. Fogueiro et al. en 2020 no encontraron diferencias significativas de textura entre el uso de los 3 coagulantes vegetales, pero sí se han encontrado en otros estudios. Barracosa et al. (2021) estudiaron cómo afectaba la variedad genética de las flores de cardo en la producción de quesos artesanales. Para ello, elaboraron 3 quesos con las plantas 3M, 5M y 6M con un mismo lote de leche cruda de oveja, que se maduraron durante 45 días. Finalmente, pudieron observar diferencias en la textura. El queso coagulado con el extracto de la planta 3M liberó 8,5 L de suero de los 10 litros de leche iniciales, y la textura final fue más firme y pegajosa, con mayor adhesividad de la corteza y firmeza interna más baja. Los otros dos quesos liberaron en torno a 7 L de suero, obteniendo el elaborado con el extracto de la planta 5M una menor pegajosidad y adhesividad y el elaborado con el extracto de la planta 6M, una mayor firmeza interior. Concluyeron que, aunque el drenaje de suero depende de más factores que el coagulante, en este caso la actividad proteolítica no específica en el queso elaborado a partir de la planta 3M parecía indicar que la liberación de suero pudiese ser un buen indicador para predecir la textura del queso. Además, pudieron correlacionar la baja tasa de agregación micelar de la planta 3M con una baja firmeza y suavidad en el queso.

En la Figura 3 se observan las diferencias de textura y consistencia que presentan en el interior y en el exterior los 3 quesos elaborados por Barracosa et al. (2021) con las flores de cardo 3M (A1, A2), 5M (B1, B2) y 6M (C1, C2) anteriormente mencionadas, todas ellas de la variedad *C. cardunculus* var. *atilis*.

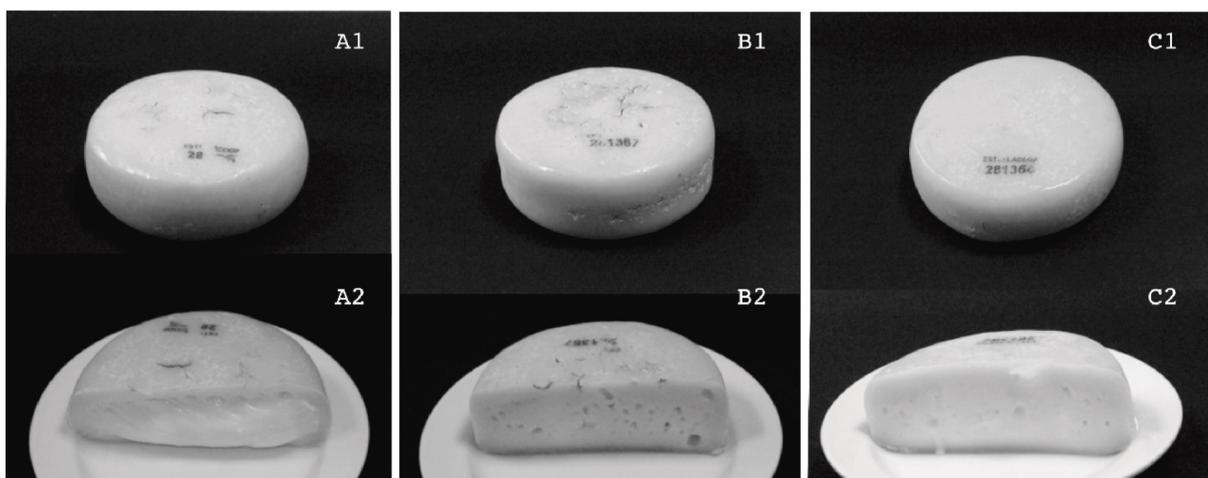


Figura 3. Imagen obtenida del estudio *Biochemical diversity of cardoon flowers (Cynara cardunculus L.)* Barracosa, et al., (2021).

Comparación entre cuajo animal y extracto de *Cynara spp*

Diferentes estudios han llevado a cabo la comparación de las características de los quesos elaborados con cuajo animal y con coagulante vegetal de cardo. Las principales características que son objeto de comparación son la textura y el sabor. Pereira et al. (2011) realizaron la comparación de quesos Serra con cuajo animal de abomaso de ternero (LusoCoalho, Montes da Senhora, Portugal) y cuajo vegetal de las flores de la flor de cardo silvestre, *Cynara cardunculus* L. (Formulab, Maia, Portugal). Prados (2005) comparó el cuajo animal, un coagulante vegetal liofilizado a partir de flores de cardos silvestres de *Cynara cardunculus* y cipsosina tipo 3 recombinante para la elaboración de Queso Manchego. Zikiou y Zidoune (2019) compararon el efecto de ambos coagulantes en la elaboración de queso Camembert. Estrada et al. (2019) compararon el cuajo animal con 3 concentraciones diferentes de extracto de cardo (5%, 3,5% y 2,5%) para la elaboración de queso de pasta dura de oveja, mientras que Escolar (2016) comparó el cuajo de cordero con el coagulante vegetal para la elaboración de queso de oveja Guirra, siguiendo el protocolo de elaboración del queso manchego.

En cuanto a la textura, Pereira et al. (2011) obtuvieron diferencias significativas y la atribuyeron a la actividad proteolítica de los coagulantes de cardo. Aun así, con ambos tipos de coagulantes, los quesos tenían más atributos elásticos que viscosos. También Prados (2005) encontró diferencias en la textura, siendo los quesos elaborados con coagulante vegetal liofilizado menos duros y firmes y más cremosos. Sin embargo, las diferencias de dureza de la corteza y la pasta debidas al tipo de coagulante obtenidas por Estrada et al. (2019) no fueron significativas. El tiempo de maduración sí que fue significativo en la textura de los quesos. Escolar (2016) también obtuvo valores de textura similares en los quesos con cuajo y en los quesos con coagulante vegetal. Por lo tanto, comprobaron como el coagulante vegetal con extracto de cardo puede utilizarse para elaborar quesos de pasta dura.

Los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos fueron determinados por Prados (2005) obteniendo las principales diferencias en la actividad de agua, el nitrógeno soluble y las tasas de nitrógeno no proteico (NNP), nitrógeno aminoacídico (NAA), nitrógeno amoniacal ($N-NH_3$) y grupos amino libres ($N-NH_2$). No hubo grandes diferencias en los contenidos de minerales, en el perfil de ácidos grasos esterificados ni en los parámetros microbiológicos. Los microorganismos encontrados fueron disminuye conforme avanzaba la maduración, y no hubo diferencias entre cuajo y coagulante vegetal debido a que este último estaba liofilizado. Zikiou y Zidoune (2019) tampoco encontraron diferencias significativas en el pH, acidez y contenido de grasa, pero sí en el contenido de sólidos totales, que era mayor en el queso elaborado con coagulante vegetal. Estrada et al. (2019) sí que encontraron diferencias significativas en el contenido lipídico, de lactosa y extracto seco. El queso elaborado con el extracto de cardo a una concentración de 2,5% tuvo más grasa, menos lactosa y mayor extracto

seco magro. Escolar (2016) también obtuvo mayor extracto seco y contenido de grasa en los quesos de coagulante vegetal, además de presentar una mayor proteólisis.

En cuanto al perfil sensorial, Prados (2005) observó que los quesos elaborados con coagulante vegetal liofilizado presentaban mayor olor y sabor, olor ácido y picante y color más intenso. El sabor amargo fue ligeramente menor en los quesos obtenidos con quimosina. Escolar (2016) encontró un mayor contenido de los ácidos grasos responsables del aroma en el queso de cuajo animal, que eran más oscuros y amarillos. La aceptación global y el análisis sensorial por los consumidores fue similar en ambos quesos. Estrada et al. (2019) obtuvieron una mayor aceptabilidad, con diferencias significativas, en el queso elaborado con coagulante vegetal a concentración 5%, que obtuvo notas promedio de 7,02. La aceptabilidad fue en los otros 3 tipos de quesos, elaborados con cuajo, y con coagulante vegetal a 3,5% y a 2,5%, obteniendo notas promedio de 6,70, 6,60 y 6,88, respectivamente. El agrado del sabor y la textura también fue significativamente mayor en el queso elaborado con coagulante vegetal al 5% y la preferencia de este queso fue del 30%, frente a 26,7% del queso elaborado con cuajo, y 24,9% y 16,8% para los quesos elaborados con coagulante vegetal a concentraciones 2,5% y 3,5%, respectivamente.

Las diferencias obtenidas entre los diversos estudios pueden asociarse tanto a la variabilidad genética de *Cynara spp.* como al tipo de queso elaborado y al control de las numerosas variables del proceso de elaboración, como pueden ser las concentraciones de los extractos o los tiempos y temperaturas en las que se produce la coagulación.

4.5.1. Rendimiento quesero

En la elaboración de queso, es importante la relación de actividad coagulante, que es aquella que afecta al enlace Phe105-Met106 de las k-caseínas, y la actividad proteolítica no específica para determinar el rendimiento quesero. Cuando se tiene una alta actividad coagulante, el rendimiento quesero es alto, se obtienen quesos más firmes. Cuando se manifiesta una alta actividad proteolítica no específica, se producen coagulaciones más lentas y texturas más suaves y menos firmes, con posibles sabores amargos (Barracosa et al., 2021).

Varios estudios han señalado que la relación entre la actividad coagulante y la actividad proteolítica no específica es menor en los coagulantes de extracto de cardo que en la quimosina y en el cuajo, aunque este efecto podría ser más destacable en la leche de oveja que en la de vaca (Gomes et al., 2019). En el estudio de Ordiales (2013), se obtuvo un valor medio de rendimiento de cuajada del 23,8% para Quesos de la Torta del Casar a los 2 días de la elaboración, aunque en otros estudios previos obtuvieron resultados más bajos para este queso, en torno al 16,5-20% (Mayoral et al., citado

por Ordiales, 2013). En el caso de Fogueiro et al. (2020) el rendimiento medio de 0,241 kg/L, es decir un 24,1%, para quesos Serra da Estrela. Zikiou y Zidoune (2019) obtuvieron los valores de rendimiento quesero tras 20 días de maduración, obteniendo 7,02% para el coagulante vegetal y 8,58% para el cuajo comercial, lo cual fue altamente significativo. Llorente et al. (2004) compararon el rendimiento quesero de coagulante vegetal obtenido a partir de *C. scolymus* y cuajo para elaborar quesos gouda, obteniendo el mismo rendimiento para ambos, siendo del 9% al final de la maduración.

También se estudia la relación entre actividad coagulante y actividad proteolítica del coagulante a partir de extracto de cardo y de cuajo animal. Zikiou y Zidoune (2019) obtuvieron una actividad coagulante de 0,7 (U/mg) en el extracto de cardo y 1,44 (U/mg) en el cuajo animal frente a la actividad proteolítica que fue de 4,83 (U/mg) en el extracto de cardo y de 2,4 (U/mg) en el cuajo animal.

Los resultados de rendimiento quesero en el estudio realizado por Estrada et al. (2019) expresados en relación de litros de leche necesarios para elaborar un kilo de queso, fueron de 4,43 para el queso elaborado con cuajo, 4,41 para el queso elaborado con extracto de *Cyanra* a concentración 5%, 4,78% para el queso a concentración de 3,5% y 4,42 para el queso a concentración 2,5%. Estos resultados no supusieron diferencias significativas. Tampoco las obtuvo Escolar (2016), que, aunque obtuvo una mayor proteólisis en los quesos de cuajo vegetal, esto no afectó al rendimiento quesero ni al tiempo de coagulación, que fue similar en ambos quesos.

5. Conclusiones

- 1 El uso del coagulante vegetal está extendido principalmente en Portugal y España, en su mayoría se obtiene de *Cynara cardunculus* y produce quesos de pasta blanda o semiblanda, con excepción de aquellos que son madurados por más tiempo, que son de pasta semidura o dura. Los quesos comercializados con las características descritas tienen gran aceptación por el consumidor.
- 2 En las queserías donde se utiliza coagulante vegetal, éste se obtiene por maceración en agua, y no se suele realizar un control de la concentración del extracto. Las enzimas procedentes de *Cynara* presentan, por lo general, una relación entre la actividad proteolítica y la actividad coagulante mayor que la de la quimosina animal y el cuajo. Esto afecta a la textura de los quesos, obteniendo quesos generalmente de pasta blanda, así como al sabor debido a la producción de péptidos amargos.
- 3 Los factores que más afectan a la actividad coagulante y proteolítica de los extractos de cardo como coagulantes son la diversidad genética de las plantas, dentro y fuera de la misma variedad, la concentración de cardo y la cantidad de extracto macerado que se añade a la leche.
- 4 El control de dichos factores durante la obtención del coagulante a base de extracto de flores de cardo y la coagulación de la leche para la elaboración de los quesos, permite la posibilidad de que este coagulante vegetal sustituya el cuajo o la quimosina sin afectar a las características finales del queso. Este control permite incluso la elaboración de quesos de pasta dura.
- 5 La comercialización a nivel industrial de coagulante vegetal a partir de las flores del género *Cynara* es posible, ya que se han obtenido tiempos de coagulación y características de producto óptimos para ello. Conllevaría una estandarización del producto final debido al mayor control que se realiza sobre la obtención del extracto, lo que afecta directamente a las características del queso.

6. Conclusions

1. The use of the vegetable coagulant is widespread mainly in Portugal and Spain, mostly obtained from *Cynara cardunculus* and produces soft or semi-soft cheeses, with the exception of those matured for a longer period, which are semi-hard or hard. The cheeses marketed with the characteristics described are very popular with consumers.
2. In cheese dairies where vegetable coagulant is used, it is obtained by maceration in water, and the concentration of the extract is not usually controlled. Enzymes from *Cynara* generally have a higher ratio of proteolytic to coagulating activity than animal chymosin and rennet. This affects the texture of the cheeses, generally resulting in soft cheeses, as well as the taste due to the production of bitter peptides.
3. The factors that most affect the coagulating and proteolytic activity of thistle extracts as coagulants are the genetic diversity of the plants, within and outside the same variety, the concentration of thistle and the amount of macerated extract added to the milk.
4. The control of these factors during the production of the coagulant based on thistle flower extract and the coagulation of the milk for cheese making allows the possibility of this plant-based coagulant replacing rennet or chymosin without affecting the final characteristics of the cheese. This control even allows the production of hard cheeses.
5. The industrial commercialisation of vegetable coagulant from *Cynara* flowers is possible, as optimal coagulation times and product characteristics have been obtained. It would lead to a standardisation of the final product due to the greater control over the obtaining of the extract, which directly affects the characteristics of the cheese.

7. Valoración personal

Respecto al tema tratado, durante la realización de esta revisión bibliográfica he podido observar cómo el objetivo principal de los ensayos y estudios realizados en torno a *Cynara como coagulante para la elaboración de quesos* es conseguir una estandarización tanto del coagulante como de los quesos producidos con el mismo. En queserías tradicionales esto podría conllevar una mejor trazabilidad del producto, mayor seguridad alimentaria y un producto más homogéneo, sin perder los métodos tradicionales que aportan calidad al producto. A nivel industrial, podría suponer la sustitución del cuajo o la quimosina animal en las elaboraciones de quesos con grandes volúmenes de producción y convirtiéndolos en aptos para ciertas dietas que no consumen el cuajo animal.

La comunidad científica ha realizado numerosos estudios sobre los temas tratados en esta revisión bibliográfica, por lo que, desde mi percepción, es posible que este producto sea estandarizado y aumente su uso a nivel industrial.

Durante el proceso de elaboración de esta revisión bibliográfica he podido agilizar el proceso de obtención, selección y gestión de información aportada por los diferentes estudios realizados, pudiendo realizar una mayor focalización en las diferentes búsquedas y obteniendo recursos para llegar a información menos accesible al estar publicada en otros países o idiomas. También he podido conocer nuevas herramientas como el análisis de los componentes principales (PCA), que muchos estudios utilizan para el análisis de las variables.

8. Bibliografía

- Almeida, C.M. y Simões, I. (2018). "Cardoon-based rennets for cheese production". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(11), pp. 4675-4686 DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9032-3>.
- Alves, S.M. (2003). "Estudo do efeito de alguns factores tecnológicos na coagulação do leite com extractos de cardo (*Cynara cardunculus* L.)". *Relatório do trabalho de fim de curso de Engenharia Agro-Industrial. ISA. UTL. Lisboa*.
- Araújo-Rodrigues, H., Tavaría, F.K., dos Santos, M.T.P.G., Alvarenga, N. y Pintado, M.M. (2020). "A review on microbiological and technological aspects of Serpa PDO cheese: An ovine raw milk cheese". *International Dairy Journal*, 100, pp. 104561 DOI: 10.1016/j.idairyj.2019.104561.
- Barracosa, P., Simões, I., Martins, A.P., Barros, M. y Pires, E. (2021). "Biochemical diversity of cardoon flowers (*Cynara cardunculus* L.): Predicting PDO Mediterranean cheese textures". *Food Bioscience*, 39, pp. 100805 DOI: 10.1016/j.fbio.2020.100805.
- Barracosa, P., Rosa, N., Barros, M. y Pires, E. (2018). "Selected Cardoon (*Cynara cardunculus* L.) Genotypes Suitable for PDO Cheeses in Mediterranean Regions". *Chemistry & Biodiversity*, 15(7), pp. e1800110 DOI: 10.1002/cbdv.201800110.
- Benheddi, W. y Hellal, A. (2019). "Technological characterization and sensory evaluation of a traditional Algerian fresh cheese clotted with *Cynara cardunculus* L. flowers and lactic acid bacteria". *Journal of Food Science and Technology*, 56(7), pp. 3431-3438 DOI: 10.1007/s13197-019-03828-0.
- Bivar Roseiro, L., Barbosa, M., Ames, J.M. y Wilbey, R. A. (2003). Cheesemaking with vegetable coagulants—the use of *Cynara* L. for the production of ovine milk cheeses. *International Journal of Dairy Technology*, 56(2), pp. 76-85. DOI: <https://doi-org.cuarzo.unizar.es:9443/10.1046/j.1471-0307.2003.00080.x>
- Certificação de Produtos da Beira, Lda, (2011) *Caderno de especificações do Queijo Serra da Estrela. Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural* Disponible en: [Produtos Tradicionais Portugueses - Queijo Serra da Estrela DOP \(dgadr.gov.pt\)](http://produtos.tradicionaisportugueses-queijo.serra.dop.dgadr.gov.pt)
- Conceição, C., Martins, P., Alvarenga, N., Dias, J., Lamy, E., Garrido, L., Gomes, S., Freitas, S., Belo, A. y Brás, T. (2018). "*Cynara cardunculus*: Use in cheesemaking and pharmaceutical applications".

IntechOpen London, UK, pp. 73-107. Disponible en: *Technological approaches for novel applications in dairy processing*. Disponible en: [Technological Approaches for Novel Applications in Dairy Processing - Google Libros](#)

Consejo Regulador de la Torta del Casar. *Pliego de condiciones de la Denominación de Origen Protegida "Torta del Casar"*. Disponible en: <https://www.juntaex.es/documents/77055/621148/DOP+Torta+del+Casar.+Pliego+condicion.es.pdf/15e1d1a3-dc26-206f-7300-1a1d8e486e1e?t=1666696151839>.

Cristina Mallor (2018). "El cultivo de *Cynara cardunculus* L. para su uso como coagulante vegetal." *Jornada "Tradición e innovación en el sector quesero de Teruel"*. Teruel, 15 de noviembre de 2018 Disponible en: <http://hdl.handle.net/10532/4494>

Escolar Saval, E. (2016). *Producción, composición y características de la leche y del queso en la oveja Guirra*. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Disponible en: [Producción, composición y características de la leche y del queso en la ove...: .AlcorZe \(ebSCOhost.com\)](#)

Estrada Korta, O., Ariño Moneva, A.A., y Juan Esteban, T. (2019). Estudio de consumidores de quesos de oveja de pasta dura elaborados con coagulante vegetal. *III Congreso de la Asociación Española de Profesionales del Análisis Sensorial*. San Sebastián, 26 - 28 de junio de 2019. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10532/4738>

Estrada Korta, O., Ariño Moneva, A.A., Mallor Giménez, C. y Juan Esteban, T. (2019) Elaboración de queso pasta dura con coagulante vegetal (*Cynara cardunculus* L.): efecto en la textura instrumental durante la maduración. *XVIII Jornadas sobre Producción Animal*. Zaragoza, 7 y 8 de mayo de 2019, pp. 621-623. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10532/4681>

Estrada Korta, O., Ariño Moneva, A.A., Román, M. y Juan Esteban, T. (2019). Elaboración de queso de pasta dura con coagulante vegetal (*Cynara cardunculus* L.): efecto en el rendimiento quesero y composición del lactosuero. *XVIII Jornadas sobre Producción Animal*. Zaragoza, 7 y 8 de mayo de 2019, pp. 618-620. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10532/4680>

European Commission, 2022. e.Ambrosia. The EU geographical indications register. Disponible en: <https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/food-safety-and-quality/certification/quality-labels/geographical-indications-register/> Consultado: 29/11/2022

Feijoo Siota, L. (2018). *Producción biotecnológica de proteasas aspárticas vegetales para la elaboración de nuevos productos lácteos*. Tesis doctoral. Escuela de doctorado internacional

en ciencias de la salud. Santiago de Compostela. Disponible en:
<http://hdl.handle.net/10347/18017>

Fogeiro, É, Barracosa, P., Oliveira, J. y Wessel, D.F. (2020). "Influence of Cardoon Flower (*Cynara cardunculus* L.) and Flock Lactation Stage in PDO Serra da Estrela Cheese". *Foods*, 9(4), pp. 386. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/foods9040386>

Folgado, A., Pires, A.S., Figueiredo, A.C., Pimentel, C. y Abranches, R. (2020). "Toward alternative sources of milk coagulants for cheese manufacturing: establishment of hairy roots culture and protease characterization from *Cynara cardunculus* L.". *Plant Cell Reports*, 39(1), pp. 89-100 DOI: 10.1007/s00299-019-02475-1.

García Alcaraz, V. (2015) *Estudio del empleo de coagulantes vegetales en la elaboración de quesos de cabra*. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10201/46026>

García Alcaraz, V., Rovira, S., Teruel, R., Roa, I., & López, M. B. (2011). Empleo de coagulantes vegetales en leche de cabra murciano-granadina. *Anales de Veterinaria de Murcia*, 27, 73–84. <https://doi.org/10.6018/j/160161>

Gomes, S., Belo, A.T., Alvarenga, N., Dias, J., Lage, P., Pinheiro, C., Pinto-Cruz, C., Brás, T., Duarte, M.F. y Martins, A.P.L. (2019). "Characterization of *Cynara cardunculus* L. flower from Alentejo as a coagulant agent for cheesemaking". *International Dairy Journal*, 91, pp. 178-184 DOI: 10.1016/j.idairyj.2018.09.010.

Japón Quintero, J., (1986). *Cultivo del cardo*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España. Hojas divulgadoras nº 12/1986.

Llorente, B.E., Obregón, W.D., Avilés, F.X., Caffini, N.O. y Vairo-Cavalli, S. (2014). "Use of artichoke (*Cynara scolymus*) flower extract as a substitute for bovine rennet in the manufacture of Gouda-type cheese: Characterization of aspartic proteases". *Food Chemistry*, 159, pp. 55-63 DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.03.007.

Martins, A. (1999). *Una flor de cardo (Cynara cardunculus L.) como agente coagulante no fab rico de queijo. Caracterização e influência dos processos de conservação na actividade coagulante.*, Universidad de Lisboa.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España, (2020). *Datos de las D.O.P., I.G.P. y E.T.G. de Productos Agroalimentarios*. Disponible en :

https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/calidad-diferenciada/informedop_igp_2020_definitivo_tcm30-578610.pdf.

Orden de 14 de enero de 1988, por la que se aprueba la norma general de identidad y pureza para el cuajo y otras enzimas coagulantes de leche destinados al mercado interior. *Boletín Oficial del Estado*, nº 17, de 20 de enero de 1988. Modificación de 29 marzo de 2013.

Orden de 27 de marzo de 2007, por la que se corrige la Orden de 15 de marzo de 2007, que adopta decisión favorable en relación con la solicitud de registro de la Denominación de Origen Protegida "Queso Flor de Guía y Queso de Guía". *Boletín Oficial de Canarias*, nº 65, de 30 de marzo de 2007.

Ordiales Rey, E. (2013). "*Caracterización del cardo ('Cynara cardunculus, L') para su uso como cuajo vegetal en el proceso de elaboración de la Torta del Casar*". Tesis doctoral. Escuela de ingenierías agrarias, Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Disponible en: [*TDUEX_2013_Ordiales_Rey.pdf \(unex.es\)](#)

Pereira, C.I., Franco, M.I., Gomes, A.M.P. y Malcata, F.X. (2011). "Microbiological, rheological and sensory characterization of Portuguese model cheeses manufactured from several milk sources". *LWT - Food Science and Technology*, 44(10), pp. 2244-2252 DOI: 10.1016/j.lwt.2011.06.013.

Prados Siles, F. (2005). *Estudio de las características bioquímicas, físico-químicas, microbiológicas y sensoriales de quesos tipo Manchego elaborados con diversos tipos de coagulante*. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba, Servicio de Publicaciones. Disponible en: <https://digitum.um.es/digitum/handle/10201/46026>

Real Decreto 1113/2006, de 29 de septiembre, por el que se aprueban las normas de calidad para quesos y quesos fundidos. *Boletín Oficial del Estado*, nº 239, de 6 de octubre de 2006.

Silva, S.V. y Malcata, F.X. (2005). "Studies pertaining to coagulant and proteolytic activities of plant proteases from *Cynara cardunculus*". *Food Chemistry*, 89(1), pp. 19-26 DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.01.074.

Tavaria, F.K., Sousa, M.J. y Malcata, F.X. (2001). "*Storage and lyophilization effects of extracts of Cynara cardunculus on the degradation of ovine and caprine caseins*". *Food Chemistry*, 72(1), pp. 79-88.

- Tovar, R. (2016). "*Quesos de flor de cardo en la península Ibérica*". *The Foodie Studies*, (1). Disponible en: [Quesos de flor de cardo en la Península Ibérica - Thefoodiestudies](#)
- Vairo Cavalli, S., Lufrano, D., Colombo, M.L. y Priolo, N. (2013). "Properties and applications of phytepsins from thistle flowers". *Phytochemistry*, 92, pp. 16-32 DOI: 10.1016/j.phytochem.2013.04.013.
- Veríssimo, P., Esteves, C., Faro, C. y Pires, E. (1995). "The vegetable rennet of *Cynara cardunculus* L. contains two proteinases with chymosin and pepsin-like specificities". *Biotechnology Letters*, 17(6), pp. 621-626.
- Zikiou, A., Esteves, A.C., Esteves, E., Rosa, N., Gomes, S., Louro Martins, A.P., Zidoune, M.N. y Barros, M. (2020). "Algerian cardoon flowers express a large spectrum of coagulant enzymes with potential applications in cheesemaking". *International Dairy Journal*, 105, pp. 104689 DOI: 10.1016/j.idairyj.2020.104689.
- Zikiou, A. y Zidoune, M.N. (2019). "Enzymatic extract from flowers of Algerian spontaneous *Cynara cardunculus*: Milk-clotting properties and use in the manufacture of a Camembert-type cheese". *International Journal of Dairy Technology*, 72(1), pp. 89-99 DOI: 10.1111/1471-0307.12563.