

TESIS DOCTORAL



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Programa de Doctorado Ciencias de la Salud

Utilización de nuevos coagulantes vegetales para la obtención de versiones vegetarianas de quesos

Autora:

Cindy María Bande De León

Director:

Dr. D. Luis Tejada Portero

Murcia, junio de 2023

TESIS DOCTORAL



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Programa de Doctorado Ciencias de la salud

Utilización de nuevos coagulantes vegetales para la obtención de versiones vegetarianas de quesos

Autora:

Cindy María Bande De León

Director:

Dr. D. Luis Tejada Portero

Murcia, junio de 2023



AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE LA TESIS PARA SU PRESENTACIÓN

El Dr. D. Luis Tejada Portero como Director de la Tesis Doctoral titulada “Utilización de nuevos coagulantes vegetales para la obtención de versiones vegetarianas de quesos” realizada por D. Cindy María Bande De León en el Programa de Doctorado Ciencias de la salud, **autoriza su presentación a trámite** dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al Real Decreto 99/2011 de 28 de enero, en Murcia a 30 de junio de 2023.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Luis Tejada Portero', written over a light blue grid background.

Dr. Luis Tejada Portero

RESUMEN

TÍTULO: Utilización de nuevos coagulantes vegetales para la obtención de versiones vegetarianas de quesos

Introducción: En algunos países del Mediterráneo las plantas herbáceas perennes conocidas como “cardos” se han utilizado desde la antigüedad como agentes coagulantes en la producción de quesos tradicionales de leche de oveja, de cabra, o una mezcla de ambas. Estos quesos se caracterizan por su textura y flavor único y distintivo muy apreciado por los consumidores y que es conferido por el empleo de los coagulantes vegetales a base de cardos. Motivaciones de salud, religiosas y de cambios en los hábitos alimenticios y en la dieta han propiciado un aumento de la demanda de versiones vegetarianas de quesos y de sustitutos del cuajo animal. El desarrollo de nuevos alimentos o ingredientes funcionales con efectos beneficiosos para la salud se ha favorecido por la creciente preocupación de la población por su salud, siendo los productos lácteos los que han demostrado poseer mayor cantidad de péptidos con bioactividad.

Objetivos: El objetivo de este estudio fue caracterizar las especies de cardo *Cynara humilis*, *Onopordum tauricum* y *Onopordum platylepis* a nivel tecnológico y evaluar la utilización de algunas de ellas en la elaboración de versiones vegetarianas de quesos tipo “Murcia al vino” y su efecto sobre las características finales del producto. Así como también determinar la generación de péptidos bioactivos en hidrolizados de caseína empleando los extractos de cardo.

Resultados: En la caracterización tecnológica de las especies experimentales de cardo se observó un comportamiento similar al de las especies comunes utilizadas tradicionalmente en la elaboración de queso, demostrando estabilidad térmica hasta los 70°C, un carácter ácido presentando mayor actividad a valores de pH de 5.0-5.5, e incrementaron su actividad a mayor concentración de extracto y de CaCl₂ hasta los 60 mM. Además, la actividad caseinolítica aumentó a mayor tiempo de hidrolisis y concentración de extracto. Los geles de leche de oveja y cabra de los extractos vegetales experimentales demostraron una menor firmeza, menor capacidad de retención de agua, y una mayor pérdida de componentes nitrogenados ($p < 0,05$) excepto por la especie *O. platylepis* que en leche de oveja su capacidad de retención de agua fue similar a la de los coagulantes a base de quimosina.

El tipo de coagulante tuvo un efecto significativo ($p < 0,05$) sobre las características fisicoquímicas y sensoriales del producto final, encontrándose mayores valores en el contenido de extracto seco en quesos coagulados con los coagulantes vegetales, así como puntuaciones más altas en los atributos de flavor y olor; todo relacionado con el marcado carácter proteolítico de las proteinasas aspárticas. La dureza del producto final fue significativamente diferente entre las distintas especies de cardo experimentales, siendo menor en quesos elaborados con *C. cardunculus* que en los elaborados con *C. humilis*, debido a la menor capacidad proteolítica de esta última. Las diferencias sobre el recuento de microorganismos se deben sobre todo a las diferencias en el proceso de elaboración del coagulante encontrándose menor recuento de levaduras en el extracto liofilizado frente a los extractos acuosos de cardo. La especie de cardo tuvo un efecto significativo ($p < 0,05$) sobre la proteólisis del producto final demostrando mayor contenido de NNP, NS, y péptidos hidrófobos en quesos elaborados con *Onopordum platylepis* frente a los elaborados con *Cynara humilis*. La aceptación por parte de los consumidores por los quesos elaborados con coagulante vegetal fue mayor ($p < 0,05$) tras recibir información sobre el tipo de coagulante empleado.

Se encontraron secuencias de péptidos con bioactividad en los hidrolizados de caseína bovina elaborados con las especies de cardo *Cynara cardunculus*, *Cynara humilis* y *Onopordum platylepis*.

Conclusiones: Las especies de cardo *Cynara humilis* L. y *Onopordum platylepis* Murb. demostraron ser agentes coagulantes válidos para la producción de versiones vegetarianas de quesos tipo “Murcia al vino” con características sensoriales diferenciales permitiendo su diversificación en el mercado. También se evidenció su capacidad de generar péptidos bioactivos, tras hidrólisis enzimática de caseína, con actividad inhibidora de la ECA, inhibidora de la DPP-IV, inhibidora de CaMPDE, inmunomoduladora, antioxidante, antiviral, antimicrobiana, hemolítica, osteoanabólico e inhibidor de la lipoxigenasa.

Palabras clave: Coagulantes vegetales, Murcia al vino, péptidos bioactivos.

ABSTRACT

TITLE: Use of new vegetable coagulants for the development of vegetarian cheese versions

Introduction: In some Mediterranean countries, perennial herbaceous plants known as "thistles" have been used since ancient times as coagulating agents in the production of traditional cheeses made from sheep's milk, goat's milk, or a mixture of both. These cheeses are characterized by their unique and distinctive texture and flavor, which is highly appreciated by consumers and is conferred by the use of thistle-based vegetable coagulants. Health, religion, and changes in eating habits and diet have led to an increase in demand for vegetarian versions of cheeses and animal rennet substitutes. The development of new functional foods or ingredients with beneficial effects on health has been favored by the growing concern of the population for their health, with dairy products being the ones that have been shown to possess the greatest amount of bioactive peptides.

Objectives: The aim of this study was to characterize the thistle species *Cynara humilis*, *Onopordum tauricum* and *Onopordum platylepis* at the technological level and to evaluate the use of some of them in the elaboration of vegetarian versions of "Murcia al vino" type cheeses and their effect on the final characteristics of the product. Also, to determine the generation of bioactive peptides in casein hydrolysates using thistle extracts.

Results: In the technological characterization of the experimental thistle species, a similar behavior to that of the common species traditionally used in cheese production was observed, showing thermal stability up to 70°C, an acidic character presenting greater activity at pH values of 5.0-5.5, and increased activity at higher concentrations of extract and CaCl₂ concentration up to 60 mM. In addition, caseinolytic activity increased with increasing hydrolysis time and extract concentration. Sheep and goat milk gels of the experimental plant extracts showed lower firmness, lower water holding capacity, and higher loss of nitrogenous components ($p < 0.05$) except for *O. platylepis* species which in sheep milk its water holding capacity was similar to that of chymosin-like coagulants.

The type of coagulant had a significant effect ($p < 0.05$) on the physicochemical and sensory characteristics of the final product, finding higher values of pH and dry matter content in cheeses curdled with vegetable coagulants,

as well as higher scores in the attributes of flavor and odor; all related to the marked proteolytic character of aspartic proteinases. The hardness of the final product was significantly different among the different experimental thistle species, being lower in cheeses made with *C. cardunculus* than in those made with *C. humilis*, due to the lower proteolytic capacity of the latter. The differences in the count of microorganisms are mainly due to the differences in the coagulant elaboration process, with lower yeast counts found in the freeze-dried extract compared to the aqueous extracts of thistle. The thistle species had a significant effect ($p < 0.05$) on the proteolysis of the final product, showing a higher content of NPN, WSN, and hydrophobic peptides in cheeses made with *Onopordum platylepis* compared to those made with *Cynara humilis*. Consumer acceptance of cheeses made with vegetable coagulant was higher ($p < 0.05$) after receiving information on the type of coagulant used.

Peptide sequences with bioactivity were found in bovine casein hydrolysates made with *Cynara cardunculus*, *Cynara humilis*, and *Onopordum platylepis*.

Conclusions: The thistle species *Cynara humilis* L. and *Onopordum platylepis* Murb. proved to be valid coagulating agents for the production of vegetarian versions of "Murcia al vino" type cheeses with differential sensory characteristics allowing their diversification in the market. Their capacity to generate bioactive peptides by enzymatic hydrolysis of casein was also demonstrated with ACE inhibitory, DPP-IV inhibitory, CaMPDE inhibitory, immunomodulatory, antioxidant, antiviral, antimicrobial, haemolytic, osteoanabolic and lipoxigenase inhibitory activity.

Keywords: Vegetable coagulants, Murcia al vino, bioactive peptides.

A Lola por su valentía
A mi familia por apoyarme
A mis amigas por creer en mi
A Bimba y Django por su compañía
A Jose por ayudarme a construir el camino
y caminar conmigo de la mano

AGRADECIMIENTOS

Agradezco desde lo más profundo de mi corazón y sinceramente:

A mi director de Tesis: Dr. Luis Tejada Portero por su paciencia y dedicación con mi tesis, conocimientos adquiridos, apoyo, amistad y confianza que me transmite, ayudarme a mejorar en muchos sentidos, pero el que más, profesionalmente.

A todos mis compañeros del grupo de investigación "Tecnología del procesado industrial y culinario de alimentos", y del Departamento de Nutrición, Tecnología de Alimentos y Gastronomía: Adela, Noelia, Estefanía, Eva, José M^a, Manolo, Pablo, Gregorio, Paco, Pura, Alfonso, Pellicer, y Julia.

A todos los profesionales y compañeros del proyecto VEGGIE-MED-CHEESES, gracias por permitirme aprender de todos ustedes y trabajar conmigo de la mano para sacar adelante el proyecto. Espero que volvamos a coincidir en un futuro.

A Giorgia, por su amistad y su apoyo incondicional, por contar conmigo en las buenas y en las malas, por escucharme y por ayudarme.

Agradecer a la DOP Queso de Murcia al vino, a su director Eduardo, y a la DOP Torta del casar, a su director Javier.

A la quesería Doña Francisca, a Diego y Jorge; y a la quesería TGT Tio Resti, especialmente a sus maestros queseros Juan y Jordi.

A todos mis compañeros del HiTech y todos los compañeros con los que he compartido horas y horas en el laboratorio desde que empecé este proyecto: Cristina, Chemi, Laura, Ainhoa, Teresa, Sara, Victoria, Gabi, José Manuel, Pepa, David, Camilo, Ramiro, Iván, Dennis, Clara, Begoña, Raúl, Rubén 1, Rubén 2, Silvia, Horacio, Luis, y a Ylenia, por nuestra amistad.

A mi profesora y tutora Juana Morillas, por ayudarme a integrarme, a dar mis primeros pasos, a creer y confiar en mí. Gracias por tu apoyo, tu guía y por todo el afecto.

A todos aquellos y aquello que olvido mencionar y que me ayudaron a llegar hasta aquí.

A la UCAM, mi segundo hogar, por acogerme desde un principio. Por permitirme crecer y desarrollarme tanto personal como profesionalmente. Por el apoyo económico mediante una beca predoctoral de la Escuela Internacional de Doctorado UCAM que me permitió realizar este trabajo de investigación.

También agradecer, a todo el personal no docente de la UCAM, personal administrativo, técnicos de laboratorio, servicios de control, bedeles, trabajadores del servicio de reprografía, trabajadores de la cantina, que de una forma u otra me han ayudado y me han hecho sentir como en casa.

A toda mi familia de Venezuela, de Tenerife y de Galicia, por estar en los buenos y malos momentos, por todos los ratos que compartimos, por todo lo que he aprendido de cada uno de ustedes, por el camino que nos queda recorrer juntos. Con especial mención a Teresa, Pedro, Maite, Fermín, y Néstor, quienes aún sin conocerme, me acogieron como una nieta, una hija y una hermana más, me dieron sabios consejos, escucharon mis penas, y fueron un motor importante en muchos de mis logros. Son una familia maravillosa, pero sobre todo son personas con una calidad humana extraordinaria. Gracias por permitirme conocerlos y por creer en mí desde el principio.

A mis padres, Serafín y Ana, a mis hermanos, Christian y Erik, y a mi abuelo José, por su 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 ser mi ejemplo a seguir, por enseñarme que nunca me iban a regalar nada en la vida, por ser mi refugio, y por ser la mejor familia del mundo. A mi abuela Emilia, que desde el cielo me ha visto convertirme en una mujer y en una profesional.

A José Antonio, Josiki, Xeliki o liki, por encontrarme y demostrarme que el amor es mucho más que unas mariposas en el estómago, es respeto, es perdón, comprensión, complicidad, paciencia, empatía, admiración, cariño, compañía. Gracias por ser pañuelo, por ser luz, por ser calma y serenidad, por tu sonrisa. Solo con el corazón se puede ver bien.

En especial, agradecer a mi abuela Lola, por su valentía, por ser como una segunda madre para mí, por su amor incondicional, por consentirme, por dejar

toda su vida atrás para yo poder construir la mía. Sin ti no habría llegado lo lejos que he llegado. Aunque ahora no recuerdes todos los grandes momentos que hemos vivido juntas, te prometo no abandonarte y seguir llenándote de momentos bonitos en familia.

A Dios por sobre todas las cosas, por no abandonarme, guiarme y hacer posible todo lo que me ocurre, recordándome que todo se puede lograr cuando el amor se aplica a cada una de las cosas que hacemos.

"Me enseñaron que el camino del progreso no es rápido ni fácil". Marie Curie (1867-1934).

ARTÍCULOS PUBLICADOS

El contenido de esta Tesis Doctoral ha sido parcialmente publicado en los siguientes trabajos:

- Foligni, R., Mannozi, C., Gasparri, M., Raffaelli, N., Zamporlini, F., Tejada, L., **Bande-De León, C.**, Orsini, R., Manzi, P., Di Constanzo, M.G., Ritota, M., Aquilanti, L. & Mozzon, M. (2022). Potentialities of aqueous extract from cultivated *Onopordum tauricum* (Willd.) as milk clotting agent for cheesemaking. *Food Research International*, 158, 111592.
- **Bande-De León, C.**, Buendía-Moreno, L., Abellán, A., Manzi, P., AlMohandes Dridi, B., Essaidi, I., Aquilanti, L. & Tejada, L. (2023). Clotting and proteolytic activity of freeze-dried crude extracts obtained from wild thistles *Cynara humilis* L. and *Onopordum platylepis* Murb. *Foods*, 12, 2325.
- **Bande-De León, C.**, Delgado, D., Fernández, D., Mozzon, M., Abellán, A., Aquilanti, L. & Tejada, L. (2023). Optimization of milk-clotting and rheological properties characterization of *Onopordum platylepis* Murb. in ewe's milk. *Journal of Dairy Science*. (Enviado en proceso de revisión).

Este trabajo cuenta con el apoyo del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad- a través de la Agencia Estatal de Investigación (AEI-MINECO, PCI2019-103551, España) y se enmarca en el programa PRIMA apoyado por la Unión Europea, bajo el título del proyecto "Valorisation of thistle-curdled CHEESEs in MEDiterranean marginal areas" (VEGGIE-MED-CHEESES)

La firmante de esta Memoria ha disfrutado de un Contrato predoctoral del plan propio de la Universidad Católica de Murcia. Convocatoria 2019 (septiembre 2019-septiembre 2023).

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	7
ABSTRACT	9
AGRADECIMIENTOS	13
SIGLAS Y ABREVIATURAS	27
I - INTRODUCCIÓN	37
1.1 El queso	37
1.1.1. Producción y consumo de quesos de oveja y cabra en España	37
1.1.2. Quesos con DOP en España	39
1.1.3. Queso de Murcia al vino	42
1.1.3.1. Descripción y características	43
1.1.3.2. Proceso de elaboración	44
1.2 Coagulantes lácteos	45
1.2.1 Cuajo animal y coagulantes vegetales	45
1.2.2 Problemática del cuajo animal	48
1.2.3 Problemática actual del coagulante vegetal de <i>C. cardunculus</i>	48
1.2.4 Actividad coagulante	49
1.2.5 Actividad proteolítica en leche y queso	52
1.2.6 Influencia del tipo de coagulante sobre las características fisicoquímicas y sensoriales del queso	55
1.3 Análisis sensorial	57
1.3.1 Análisis sensorial en queso	57
1.4 Bioactividad de péptidos lácteos	59
II - JUSTIFICACIÓN	65
III - OBJETIVOS	71
IV - MATERIAL Y MÉTODO	75
4.1 Material biológico	75
4.1.1 Toma de muestras de cardos de diferentes especies	76

4.1.2.	Preparación del extracto acuoso liofilizado	77
4.1.3.	Purificación enzimática	78
4.2.	Caracterización de las propiedades tecnológicas de los coagulantes vegetales	79
4.2.1.	Determinación del contenido proteico	79
4.2.2.	Caracterización de la actividad coagulante	80
4.2.3.	Caracterización de la actividad proteolítica	81
4.2.4.	Evaluación de las propiedades reológicas de los geles.....	82
4.2.5.	Evaluación de las propiedades moleculares y enzimáticas de las proteasas purificadas	85
4.3.	Análisis de propiedades beneficiosas para la salud de los cardos	86
4.3.1.	Determinación del contenido en minerales	86
4.3.2.	Preparación de hidrolizados de caseína	86
4.3.3.	Bioactividad de los hidrolizados de caseína	86
4.4.	Elaboración de los quesos tipo	88
4.4.1.	Elaboración de los quesos tipo “Murcia al vino”	88
4.5.	Determinaciones microbiológicas	95
4.5.1.	Preparación de las muestras	95
4.5.2.	Recuentos	95
4.6.	Caracterización fisicoquímica de los quesos	96
4.6.1.	pH	96
4.6.2.	A _w	96
4.6.3.	Humedad	96
4.6.4.	Extracto seco	97
4.6.5.	Cenizas	97

4.6.6.	Grasa	97
4.6.7.	Proteína	98
4.6.8.	Cloruro sódico	99
4.7.	Evaluación de la proteólisis de los quesos	99
4.7.1.	Determinación de las fracciones nitrogenadas	99
4.7.1.1.	Nitrógeno soluble	99
4.7.1.2.	Nitrógeno no proteico	99
4.7.2.	Determinación de los aminoácidos libres	100
4.7.3.	Determinación de los péptidos hidrófobos e hidrófilos	101
4.8.	Evaluación de las características sensoriales	103
4.8.1.	Análisis instrumental de textura	103
4.8.2.	Análisis instrumental del color	104
4.8.3.	Análisis sensorial	104
4.8.3.1.	Test descriptivo	105
4.8.3.2.	Test de aceptación	106
4.9.	Análisis estadístico de los resultados	114
V –	RESULTADOS	119
5.1.	Capítulo I. Caracterización de la actividad coagulante, proteolítica y de las propiedades tecnológicas de los coagulantes vegetales	119
5.1.1.	Potencialities of aqueous extract from cultivated <i>Onopordum tauricum</i> (Willd.) as milk clotting agent for cheesemaking	121
5.1.2.	Clotting and proteolytic activity of freeze-dried crude extracts obtained from wild thistles <i>Cynara humilis</i> L. and <i>Onopordum platylepis</i> Murb.	133
5.1.3.	Optimization of milk-clotting activity and rheological properties characterization of <i>Onopordum platylepis</i> Murb. in ewe's milk.....	151

5.1.4. Validation of freeze-dried plant extract obtained from <i>Onopordum platylepis</i> Murb. as goat's milk coagulant	193
5.2. Capítulo II. Características físico-químicas, microbiológicas y sensoriales del queso de Murcia al vino elaborado con nuevos coagulantes vegetales	231
5.2.1. Influence of the type of coagulant on the compositional characteristics and sensory evaluation of goat's cheese PDO "Murcia al vino"	233
5.3. Capítulo III. Evaluación de la proteólisis del queso Murcia al vino elaborado con nuevos coagulantes vegetales	269
5.3.1. Effect of the type of coagulant on the proteolysis of PDO goat cheese "Murcia al vino" and casein hydrolysates bioactivity	271
VI – DISCUSIÓN	305
6.1. Caracterización tecnológica de los extractos de cardos	305
6.1.1. Actividad coagulante	305
6.1.2. Actividad proteolítica	309
6.1.3. Propiedades reológicas y cinética de coagulación	310
6.2. Influencia del tipo de coagulante sobre las características composicionales y sensoriales del queso Murcia al vino	315
6.3. Influencia del tipo de coagulante sobre la proteólisis del queso Murcia al vino	318
6.4. Influencia del tipo de coagulante y de la información sobre la aceptación del producto final por parte de los consumidores	320
6.5. Influencia de la especie de cardo sobre la bioactividad de los péptidos de los hidrolizados de caseína bovina	321
VII – CONCLUSIONES	327
VIII – LIMITACIONES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN	333
IX – REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	339

SIGLAS Y ABREVIATURAS

A_w, Actividad de agua

α-CN, α-caseína

Abz-Gly, o-aminobenzoilglicina

Abz-Gly-Phe-(NO₂)-Pro, o-aminobenzoilglicina-p-nitro-L-fenilalanil-L-prolina

AR, cuajo animal

β-CN, β-caseína

[CaCl₂], concentración de cloruro cálcico (mM)

CaMPDE, fosfodiesterasa nucleótida cíclica dependiente de calmodulina

Caseína-FITC, caseína-isotiocianato de fluoresceína

CCA, agar cromogénico coliformes

CCS, *Cynara cardunculus* silvestre

CFC, Cetrimida, Ácido Fusídico y Cefaloridina

CFR, velocidad máxima de formación de gel (Pa*min)

CHS, *Cynara humilis* silvestre

COM, coagulante líquido vegetal comercial

D.O.P, Denominación de Origen Protegida

DPPH, 2,2-difenil-1-picrilhidracilo

DW, peso del sobrenadante

ECA, enzima convertidora de angiotensina I

EEB, encefalopatía espongiiforme bovina

FU, unidad de fluorescencia

G', módulo elástico

G'', módulo viscoso

G'_{CFR}, punto de máxima velocidad (Pa)

G'_F, firmeza del gel al final del ensayo (Pa)

HI, Péptidos hidrofílicos

HO, Péptidos hidrófobos

HO/HI, Relación de péptidos hidrófobos/hidrófilos

κ-CN, κ-caseína

K, potasio

L1, Localización 1

L2, Localización 2

L3, Localización 3

L4, Localización 4

L5, Localización 5

LRI, Índices de retención lineal

MAX_{1D}, tiempo máximo de la primera derivada (min.)

MAX_{2D}, tiempo máximo de la segunda derivada (min.)

M, volumen de leche (mL)

MCA, actividad coagulante de la leche

MCT, tiempo de actividad coagulante (seg.)

Mg, magnesio

MIN_{2D}, tiempo mínimo de la segunda derivada (min.)

Mn, manganeso

MRS, agar de Man, Rogosa, y Sharpe

MVAR, queso de Murcia al vino elaborado con cuajo animal

MVVR, queso de Murcia al vino elaborado con coagulante vegetal

NNP, nitrógeno no proteico

NS, nitrógeno soluble

NT, nitrógeno total

OPS, *Onopordum platylepis* silvestre

OTS, *Onopordum tauricum* silvestre

OTC, *Onopordum tauricum* cultivado

PA, actividad proteolítica

-
- PAB**, Pseudomonas Agar Base
- PCA**, Plate Count Agar
- PMSE**, fluoruro de fenilmetilsulfonilo
- RB**, agar Rosa de Bengala
- RCT**, tiempo de floculación (min.)
- S**, tiempo de coagulación (seg.)
- T**, temperatura (°C)
- t₀**, tiempo de inicio de la agregación (min.)
- t_I**, zona de agregación primaria (min.)
- t_{II}**, zona de agregación secundaria (min.)
- TCA**, ácido tricloroacético
- TFA**, ácido trifluoroacético
- TPA**, análisis del perfil de textura
- Trp**, triptófano
- Tyr**, tirosina
- UC**, Unidad caseinolítica
- ufc**, unidades formadoras de colonias
- V**, volumen de coagulante (mL)
- VRBGA**, agar Bilis Glucosa con cristal violeta y rojo neutro
- WHC**, capacidad de retención de agua (%)
- Y**, peso de la cuajada
- Zn**, Zinc

ÍNDICE DE FIGURAS Y DE TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1 Evolución de la producción de queso en España en la última década38

Figura I.2 Comercialización total de quesos españoles con DOP41

Figura I.3 Censo de ganado caprino para la producción de leche en España42

Figura I.4 Hidrólisis de las caseínas de la leche y proteólisis del queso durante su maduración54

Figura IV.1 Plantas de las especies A) *Cynara cardunculus* L. B) *Cynara humilis* L.76

Figura IV.2 Plantas de las especies C) *Onopordum platylepis* Murb. D) *Onopordum tauricum* Willd.76

Figura IV.3 Preparación de los extractos liofilizados de cardos78

Figura IV.4 Determinación del contenido en proteína mediante método Bradford80

Figura IV.5 Determinación de la actividad coagulante de la leche81

Figura IV.6 Diseño experimental de la elaboración de quesos tipo Murcia al vino89

Figura IV.7 Proceso de elaboración de los quesos tipo Murcia al vino92

Figura IV.8 Calentamiento y homogeneización de la leche. Adición de los cultivos iniciadores, del cloruro cálcico y del coagulante93

Figura IV.9 Corte y lavado de la cuajada93

Figura IV.10 Moldeo y pieza de queso después del prensado94

Figura IV.11 Piezas de queso antes y después del baño con vino tinto94

Figura IV.12 Determinación del contenido en cenizas de las muestras de queso ...97

Figura IV.13 Determinación del contenido en grasa de las muestras de queso	98
Figura IV.14 Análisis del perfil de textura de las muestras de queso	103
Figura IV.15 Cabina para análisis sensorial descriptivo	105
Figura IV.16 Preparación de las muestras de queso tipo Murcia al vino para la fase visual del test sensorial descriptivo	106
Figura IV.17 Preparación de las muestras de queso tipo Murcia al vino para la fase olfativo-gustativa del test sensorial descriptivo	106
Figura IV.18 Formulario correspondiente a la Fase 1 del estudio del grado de aceptación percibida de consumidores del queso de Murcia al vino elaborado con cuajo animal y coagulante vegetal	109
Figura IV.19 Fichas de cata correspondientes a la Fase 2 del estudio del grado de aceptación esperada de consumidores del queso Murcia al vino elaborado con cuajo animal y coagulante vegetal	111
Figura IV.20 Ficha de cata correspondiente a la Fase 3 del estudio del grado de aceptación real de consumidores del queso Murcia al vino elaborado con coagulante vegetal	112
Figura IV.21 Sala de catas acondicionada para test de consumidores	113
Figura IV.22 Puesto de cata para el análisis sensorial de consumidores	113

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.1 Variación del consumo doméstico de queso en España en los últimos años	38
Tabla I.2 Variedades de quesos puros de oveja y puros de cabra con DOP en España y su volumen de producción	39
Tabla I.3 Variedades de quesos puros de oveja y puros de cabra con DOP en España y su volumen de comercialización	40
Tabla I.4 Clasificación de los cuajos y coagulantes comúnmente empleados en la elaboración de quesos	47
Tabla IV.1 Localizaciones de recolección de las muestras de cardo	77
Tabla IV.2 Programa de gradientes para la separación y cuantificación de péptidos mediante UHPLC	87
Tabla IV.3 Lotes de queso tipo Murcia al vino producidos con diferentes coagulantes	90
Tabla IV.4 Concentraciones y cantidades añadidas de los diferentes coagulantes empleados en la fabricación de los quesos tipo Murcia al vino	91
Tabla IV.5 Programa de gradientes para el análisis de péptidos hidrófobos e hidrófilos mediante RP-HPLC	102
Tabla IV.6 Características de los participantes del estudio sensorial de consumidores	107
Tabla IV.7 Diseño experimental para la evaluación de la aceptación del queso y la disposición a pagar del consumidor	108

I – INTRODUCCIÓN

I - INTRODUCCIÓN

1.1. EL QUESO

El queso es uno de los productos alimentarios fermentados más antiguos de la civilización y que ha conformado una parte vital de la dieta humana en muchas regiones del mundo (Johnson y Law, 2010). El Codex Alimentarius lo define como un producto blando, semiduro, duro y extraduro, madurado o no, y que puede ser recubierto, en el que la proporción entre las proteínas del suero y la caseína no sea superior a la de la leche. Para su elaboración se cuaja la leche (cruda, parcialmente desnatada, o desnatada), nata, suero de leche, o leche de mantequilla, la cuajada resultante se separa del suero que se desprende y finalmente el queso se madura durante un cierto tiempo (Zheng y col., 2021).

1.1.1. Producción y consumo de quesos de oveja y cabra en España

España es uno de los países con mayor variedad de quesos en el mundo, más de 150, y muchas de ellas con sellos de calidad diferenciada como Denominaciones de Origen Protegida (DOP) e Indicaciones Geográficas Protegidas (IGP). En la última década España ha aumentado en un 78,72% (Eurostat, 2022) su producción total de queso (Figura I.1), siendo actualmente el segundo productor de queso de oveja en la Unión Europea (abarcando el 31%), por detrás de Italia, y de queso de cabra (abarcando el 30%), por detrás de Francia. La producción total de queso en el año 2021 fue de 548.000 toneladas, de las cuales el 13% fue queso puro de oveja, el 12% fue queso puro de cabra y el 34% fue queso mezcla. Para el mismo año, el volumen de leche empleada en la producción de quesos se incrementó en un 0,3% en el caso de la leche de oveja y en un 2,9% en el caso de la leche de cabra. Por otro lado, la producción de quesos con DOP en el año 2021 presentó una tendencia similar, incrementándose con respecto al año 2020 en un 1,6% en el caso de quesos de oveja y en un 22,4% en el caso de quesos de cabra, según datos de MAPA (2022a).

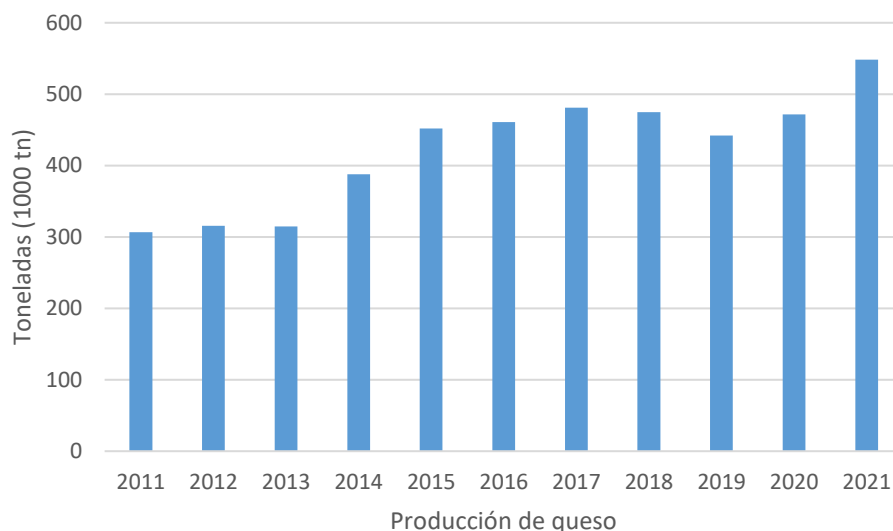


Figura I.1 Evolución de la producción de queso en España en la última década

El incremento en el consumo de queso en España ha sido progresivo a lo largo de los años (Figura I.1). Actualmente el consumo de este producto per cápita alcanza los 7,84 kg y año (Eurostat, 2022), sin embargo, en el año 2021 el consumo per cápita de este producto fue un 10,9% menor respecto al año 2020 (Tabla I.1). El consumo de queso de oveja y de cabra en España también ha ido incrementándose con los años, aunque en el 2021 ha disminuido. Un total de 14.994 toneladas de queso de oveja y 14.443 toneladas de queso de cabra fueron consumidas en España en el año 2021, respectivamente un 28 y 13% menos con respecto al año 2020 (MAPA, 2022a).

Tabla I.1 Variación del consumo doméstico de queso en España en los últimos años

	Consumo doméstico de Queso	% Variación 2021 vs 2019	% Variación 2021 vs 2020
Volumen (miles kg)	362.962,76	0,8%	-10,8%
Consumo per cápita (kg)	7,84	0,5%	-10,9%

Nota. Adaptado de *Production of cheese*, por Eurostat, 2023 (<https://ec.europa.eu/eurostat/databrowser/view/tag00040/default/table?lang=en>)

En cuanto al tipo de queso consumido en los hogares españoles, los quesos de oveja y cabra suponen un 8%, correspondiendo a un consumo per cápita de 0,317 kg y 0,305kg de queso puro de oveja y puro de cabra, respectivamente (MAPA, 2022a).

1.1.2. Quesos con DOP en España

Según los datos recogidos por MAPA (2022b), en el año 2021 habían registradas 29 variedades de quesos con calidad diferenciada en España, de las cuales 26 están registradas con DOP y las 3 variedades restantes están registradas como IGP. Dentro de las variedades de quesos con DOP, 6 de ellas se elaboran con leche pura de oveja y 6 se elaboran con leche pura de cabra.

Tabla I.2 Variedades de quesos puros de oveja y puros de cabra con DOP en España y su volumen de producción

D.O.P	Queserías registradas	Queso elaborado (kg)
Oveja		
Queso Manchego	70	17.150.026,00
Idiazábal	119	1.341.031,90
Queso de la Serena	7	18.696,60
Roncal	5	371.359,00
Queso Zamorano	9	274.436,00
Torta del Casar	7	365.739,00
Total	217	19.521.288,50
Cabra		
Queso de Murcia	7	690.714,00
Queso de Murcia al vino		610.346,00
Queso Majorero	11	623.276,00
Queso Ibores	5	89.128,00
Queso Palmero	21	129.598,00
Queso Camerano	3	47.060,00
Total	47	2.190.122,00

Nota. Adaptado de *Datos de las Denominaciones de Origen Protegidas (D.O.P.), Indicaciones Geográficas Protegidas (I.G.P.) y Especialidades Tradicionales Garantizadas (E.T.G.) de Productos Agroalimentarios. Año 2021*, por Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), 2022b.

En cuanto a la producción de los quesos de oveja con DOP, El queso Manchego supone el 87,85% de la producción total, seguido por los quesos Idiazábal con un 6,87%, muy por debajo del Manchego. Por otro lado, en cuanto a la producción de quesos con DOP elaborados con leche de cabra, El queso de Murcia lidera la producción suponiendo un 31,54% de la producción total de estos quesos, seguido por el queso Majorero con un 28,46%, y el Queso de Murcia al vino con un 27,87% (Tabla I.2).

Tabla I.3 Variedades de quesos puros de oveja y puros de cabra con DOP en España y su volumen de comercialización

D.O.P	Comercialización			
	Mercado (kg)			
	Nacional	U.E.	Países terceros	Total
Oveja				
Queso Manchego	3.840.558,00	3.437.981,97	8.750.604,70	16.029.144,67
Idiazábal	1.283.708,09	6.982,94	35.775,02	1.326.466,05
Queso de la Serena	16.070,48	2.243,59	382,53	18.696,60
Roncal	365.359,00	2.000,00	4.000,00	371.359,00
Queso Zamorano	168.781,40	2.916,50	5.338,50	177.036,40
Torta del Casar	303.113,00	14.589,00	5.226,00	322.928,00
Cabra				
Queso de Murcia	674.034,00	2.411,00	30.458,00	706.903,00
Queso de Murcia al vino	95.281,00	15.515,00	499.550,00	610.346,00
Queso Majorero	341.458,50	349,50	3.737,00	345.545,00
Queso Ibores	53.967,00	3.810,00	5.713,00	63.490,00
Queso Palmero	128.938,00	0,00	0,00	128.938,00

Queso Camerano	42.412,26	2.132,59	167,34	44.712,19
----------------	-----------	----------	--------	-----------

Nota. Adaptado de *Datos de las Denominaciones de Origen Protegidas (D.O.P.), Indicaciones Geográficas Protegidas (I.G.P.) y Especialidades Tradicionales Garantizadas (E.T.G.) de Productos Agroalimentarios. Año 2021*, por Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), 2022b.

La distribución del volumen de comercialización de estos quesos en los diferentes mercados en el año 2021 se puede observar en la Tabla I.3 (MAPA, 2022b), siendo el queso Manchego el que abarca un 87,85% de la comercialización total de los quesos de oveja con DOP centrandó su comercialización en países fuera de la Unión Europea (U.E.). Dentro de los quesos de cabra españoles con DOP, el Queso de Murcia y el Queso de Murcia al vino lideran la comercialización total representando un 37,21% y un 32,13%, respectivamente. Según los datos de MAPA (2022b) de la comercialización total de quesos españoles con especialidad DOP, para el año 2021, las variedades Queso de Murcia y Queso de Murcia al vino representan el 2,34% y 2,02% de la comercialización total (Figura I.2), siendo los de mayor porcentaje de comercialización total dentro de los quesos puros de cabra.

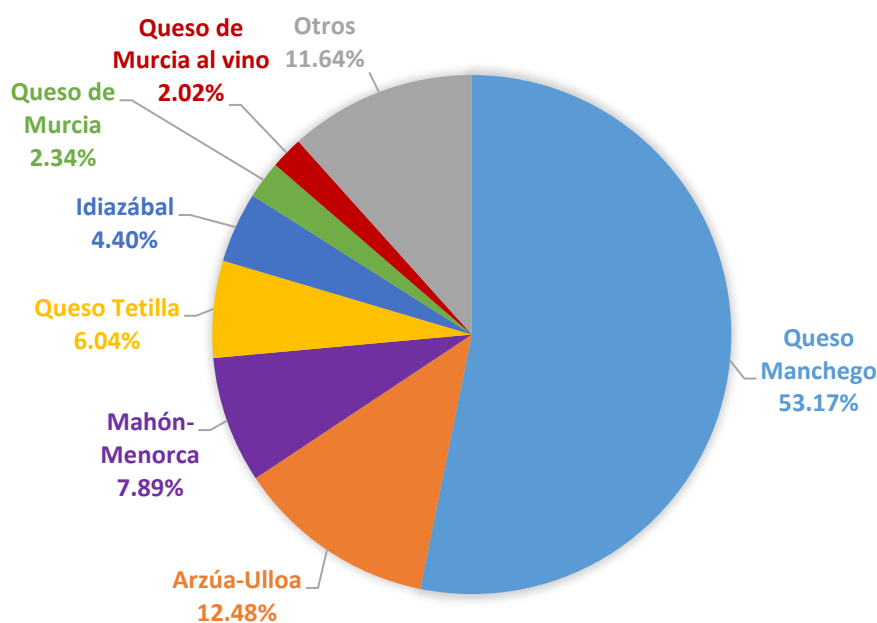


Figura I.2 Comercialización total de quesos españoles con DOP

1.1.3. Queso de Murcia al vino

El queso de Murcia al vino es un queso elaborado con leche de cabra de la raza Murciano-Granadina que se produce en la Región de Murcia en España. La Región de Murcia es una de las principales comunidades autónomas (CCAA) de España con mayor censo de ganado caprino, representando el 8% del total en el año 2021, según los datos de MAPA (2022a). En España el sector caprino se orienta principalmente a la producción láctea, así el 74% de las hembras se utilizan para el ordeño y el censo se distribuye principalmente en las CCAA de Andalucía, Castilla-La Mancha, Extremadura, Canarias, Murcia, y Castilla y León (Figura I.3).

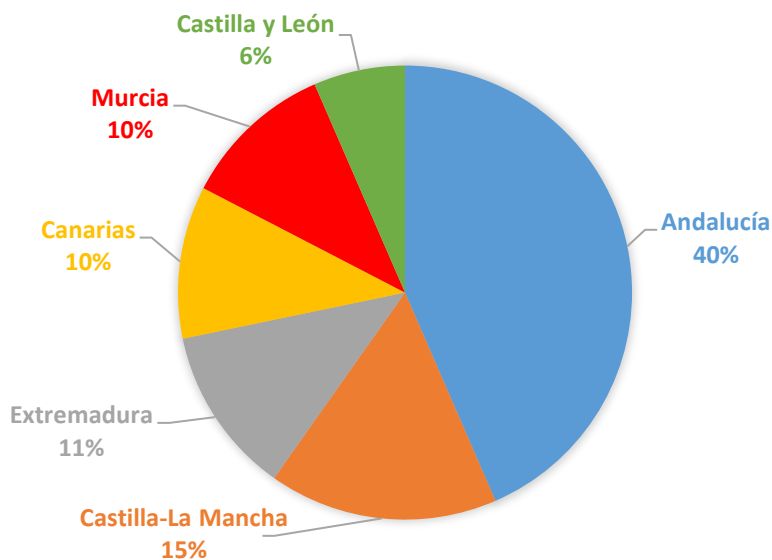


Figura I.3 Censo de ganado caprino para producción de leche en España

El fomento del sector caprino en la Región de Murcia por parte de la Consejería de Agricultura, Pesca y Alimentación y la presencia de una raza de cabra autóctona con aptitud láctea reconocida permitieron que en 1988 se firmara un convenio con la Asociación de Fomento de Quesos Artesanos para la creación de un queso puro de cabra que más adelante, en 1990, se protegería con una denominación de producto de calidad. En 1997, el Queso de Murcia y el Queso de

Murcia al vino se certificaron mediante DOP, y se creó el Consejo Regulador de dichas DOP, el cual se ratificó en el año 2001.

La zona de producción abarca todos los términos municipales de la Provincia de Murcia situada en el Sureste español, la leche empleada en su producción debe proceder exclusivamente de las ganaderías inscritas que se sitúen en la zona de producción y debe provenir de la raza autorizada. Además, el queso debe ser elaborado exclusivamente en las queserías inscritas dentro de la zona geográfica de la Región de Murcia.

La cabra Murciano-Granadina es rústica y se adapta muy bien a entornos extremos, además de caracterizarse por su alta producción lechera, la composición de su leche, especialmente rica en grasa y proteína, permite conseguir rendimientos queseros muy elevados. Presenta períodos de inactividad sexual lo que les permite a los ganaderos una mejor planificación de la explotación y la producción.

Uno de los factores que le confiere especificidad al queso de Murcia al vino son los baños en vino tinto que dan como resultado un color granate-violáceo y un aroma a vino a su corteza. Esta práctica de bañar los quesos en vino tinto durante su curación está documentada desde la antigüedad en esta Región y permite la obtención de un queso único con un gusto excelente y de gran aceptación en el mercado.

1.1.3.1. *Descripción y características*

El queso de Murcia al vino es un queso graso de pasta prensada, lavada y no cocida que se elabora con leche pasteurizada de la cabra Murciano-Granadina que se elabora mediante coagulación enzimática con cuajo animal u otras enzimas y mediante la adición de un cultivo iniciador de bacterias lácticas. Dependiendo del tamaño de la pieza su período de maduración dura entre 30 (piezas de 300-500 g) y 45 días (piezas de más de 500 g hasta 2,6 kg).

Según el Reglamento 1151/2012 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre los regímenes de calidad de los productos agrícolas y alimenticios el queso de Murcia al vino debe cumplir con unas determinadas características físicas y sensoriales. En cuanto a su apariencia externa, es de forma cilíndrica, con bordes rectos, pero no vivos y de laterales ligeramente redondeados. Presenta una corteza lisa y sin grabados y que se lava con vino tinto doble pasta que le confiere su color

violáceo característico y un olor a vino tinto o bodega. Con la masa interior blanca mate, compacta al corte y consistencia elástica, de textura cremosa y fundente, ciega o con pocos y pequeños ojos. Respecto a sus características organolépticas, posee un sabor de intensidad media, ligeramente ácido, persistente y poco salado, y un aroma suave.

1.1.3.2. *Proceso de elaboración*

El proceso de elaboración de los quesos DOP Murcia al vino consta de diez pasos y vienen descritos en el pliego de condiciones del Consejo Regulador: cuajado, corte, lavado de la cuajada, recalentamiento, trabajo del grano y desuerado, moldeado, prensado, desmoldeado, salado, y maduración (Reglamento 1151/2012).

La elaboración del queso inicia con el calentamiento de la leche previamente pasteurizada a temperatura comprendida entre 30-34 °C, una vez alcanzada la temperatura deseada, la leche se coagula durante 30-60 minutos con cuajo animal u otras enzimas coagulantes. El tratamiento de pasterización inicial de la leche contribuye a la obtención de un queso con un sabor menos intenso debido a la inactivación o reducción de la actividad de enzimas constituyentes de la leche, así como de algunos microorganismos deseables que forman parte de la microbiota natural de la leche cruda y que actúan como iniciadoras de la fermentación láctica (Chavarri y col., 2000).

Tras la obtención de la cuajada, se procede al corte de esta lo que permite aumentar la superficie de contacto y la consiguiente salida del suero. Una de las peculiaridades de la elaboración de este queso, es el lavado de la cuajada, que consiste en la eliminación del 15% del suero seguido de la adición de agua caliente para aumentar la temperatura de la cuajada a 33-39 °C, consiguiendo eliminar gran parte de la lactosa y del cuajo residual. Este paso es fundamental para conseguir un queso más suave y con menor proteólisis ya que al reducir la lactosa retenida evitamos la generación de mayores cantidades de ácido láctico lo que permite regular la evolución del pH, así como también una menor cantidad de cuajo residual reduce el grado de proteólisis durante la maduración evitando la acción inespecífica de la quimosina (Bernardo, 1991).

Para trabajar el grano se alternan periodos de agitación y reposo hasta conseguir la consistencia adecuada del grano y proceder a su moldeo,

seguidamente se procede al desuerado eliminando el suero desprendido. El moldeado se realiza mediante la introducción de la cuajada en moldes cilíndricos sin ningún tipo de grabado tanto en sus caras como en sus laterales. Una vez que la cuajada está en los moldes, se prensa de forma progresiva entre 1 y 4 horas, para luego someter a la cuajada prensada a una salazón por inmersión en salmuera fresca de cloruro de sodio.

Finalmente, se somete al queso a un período de maduración bajo unas condiciones de humedad relativa de entre 70-90% y de temperatura entre 9-13 °C y durante el cual se efectuarán las prácticas de volteo, limpieza y baño por inmersión con vino tinto de la variedad Monastrell de alguna de las menciones geográficas reconocidas de la Región de Murcia.

1.2. COAGULANTES LÁCTEOS

1.2.1. Cuajo animal y coagulantes vegetales

En la elaboración de quesos se utiliza una alta variedad de tipos de cuajo y de coagulantes. Tanto el cuajo animal como los coagulantes vegetales son una preparación de enzimas proteolíticas que se han empleado en la práctica de la elaboración de queso desde hace miles de años. Por definición, la preparación original del cuajo es un extracto de abomaso de animales rumiantes y comúnmente se denomina cuajo animal, y se ha aceptado de forma generalizada que el cuajo haga referencia a preparados enzimáticos procedentes del estómago de rumiantes, mientras que el resto de las enzimas coagulantes de la leche sean denominadas “coagulantes”. Por otro lado, también se ha aceptado que la quimosina elaborada con organismos modificados genéticamente se denomine “quimosina producida por fermentación” (Harboe y col., 2010).

Más concretamente, en la Norma general de identidad y pureza para el cuajo y otras enzimas coagulantes de leche destinados al mercado interior (BOE-A-1988-1153), define a los coagulantes de leche como preparaciones de proteinasas de origen animal, vegetal o microbiano capaces de provocar la desestabilización de la micela de caseína con la consiguiente formación de un gel lácteo en las condiciones habituales de elaboración del queso; y clasifica a los coagulantes en cinco grupos:

- Cuajo: producto obtenido exclusivamente por extracción de los cuajares de rumiantes y cuyo componente activo es la quimosina pura o mezclada con pepsina de rumiantes.
- Quimosina: es la enzima que se puede extraer de los cuajares de rumiantes mediante métodos físico-químicos o por fermentación a partir de microorganismos modificados genéticamente en el que se ha incorporado el gen responsable de la síntesis de quimosina de ternera.
- Coagulante animal: producto de diferente origen animal que el del cuajo y cuyo componente activo está constituido por quimosina y pepsina.
- Coagulante vegetal: producto de origen vegetal cuyo componente activo tiene actividad coagulante y está constituido por una o varias proteinasas procedentes de las especies de cardo (*Cynara cardunculus* y *Cynara humilis*) e higuera (*Ficus carica*).
- Coagulante microbiano: producto de origen microbiano cuyo componente activo tiene actividad coagulante y está constituido por una o varias proteinasas procedentes de las cepas: *Endothia parasitica*, *Mucor pusillus* y *Mucor miehei*.

Los coagulantes de leche también se pueden categorizar según su fuente en cuatro grupos: el cuajo animal, los coagulantes microbianos, la quimosina producida por fermentación, y los coagulantes vegetales (Tabla I.4).

El cuajo animal sigue empleándose como referente en la búsqueda de nuevos sustitutos de este, existiendo una amplia gama de composición del cuajo comercial. Tradicionalmente, se utiliza el cuajo de ternera y el cuajo de bovino adulto es su alternativa más usada debido a que contiene las mismas enzimas. En algunas ocasiones el cuajo animal se mezcla con lipasas y se forma lo que se conoce como cuajo en pasta, reconocido por generar un flavor característico en el queso. Acerca de los coagulantes microbianos, los más reconocidos son de procedencia fúngica, sin embargo, su utilización no esta tan extendida debido a que presenta una actividad proteolítica muy intensa. La quimosina producida por fermentación contiene quimosina idéntica a la que se encuentra en el cuajo animal de procedencia bovina, aunque también se ha llegado a desarrollar una quimosina procedente del camello que ha demostrado mayor especificidad por las caseínas dando lugar a un mayor rendimiento quesero y sin proporcionar amargor al queso (Liu y col., 2021).

Los coagulantes vegetales proceden de plantas y se ha encontrado una amplia variedad de enzimas coagulantes de la leche, a pesar de ello, el cardo *Cynara cardunculus* sigue siendo la planta más utilizada para este fin, especialmente en España y Portugal para la producción de quesos artesanales de leche pura de oveja o de mezcla, muy reconocidos por su autenticidad y características únicas (Jacob y col, 2011).

Tabla I.4 Clasificación de los cuajos y coagulantes comúnmente empleados en la elaboración de quesos

Tipo	Fuente	Componentes enzimáticos
Animal	Estómagos bovinos	Quimosina bovina A, B y C, pepsina A y gastricsina
	Estómagos ovinos	Quimosina y pepsina ovina
	Estómagos caprinos	Quimosina y pepsina caprina
	Cuajo en pasta	Quimosina bovina A, B y C, pepsina A, gastricsina y lipasa
Coagulante microbiano	<i>Rhizomucor miehei</i>	Proteinasa aspártica de <i>Rhizomucor miehei</i>
	<i>Cryphonectria parasitica</i>	Proteinasa aspártica de <i>Cryphonectria parasitica</i>
Quimosina producida por fermentación	<i>Aspergillus niger</i>	Quimosina B bovina o quimosina de camello
	<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>lactis</i>	Quimosina B bovina
Coagulante vegetal	<i>Cynara cardunculus</i>	Ciprosina 1, 2 y 3 y/o cardosina A y B

Nota. Adaptado de *The origins, development and basic operations of cheesemaking technology*, por M. Johnson y B.A. Law, 2010.

La extracción de las proteinasas aspárticas de los cardos se realiza mediante maceración en agua, no existiendo un procedimiento único en la elaboración de estos coagulantes vegetales y se puede decir que cada fabricante lo prepara con una metodología propia. Comúnmente se elabora el mismo día o el día anterior de la fabricación de queso, macerando en agua a temperatura ambiente las flores secas

trituras o no, durante un periodo de tiempo que varía según lo que estime cada fabricante. La proporción de flores secas y agua depende de factores como la cantidad de leche a cuajar, la experiencia de cada elaborador, entre otros (Roseiro y col., 2003).

1.2.2. Problemática del cuajo animal

Históricamente el cuajo animal extraído del estómago de animales rumiantes ha sido la preparación enzimática más utilizada en la industria láctea para la coagulación de la leche y su transformación en queso. Sin embargo, en los últimos años el cuajo animal ha perdido popularidad entre los consumidores y la demanda de sustitutos ha aumentado debido principalmente a motivaciones de salud, religiosas, de hábitos alimenticios, por el encarecimiento de su precio, o por estar en contra de los alimentos modificados genéticamente (Roseiro y col., 2003; Ben Amira y col., 2017).

Un ejemplo de esto es la incidencia de la encefalopatía esponjiforme bovina (EEB), una enfermedad que consigue un deterioro del ganado incompatible con la vida y que, en las décadas de 1980, 1990 y 2000, afectó considerablemente al sector ganadero europeo y entre sus consecuencias destaca la reducción de la disponibilidad y de la demanda del cuajo animal bovino (Babín, 2006).

Por otro lado, el uso del cuajo animal también se puede ver limitado por factores religiosos de los consumidores tales como el judaísmo y el Islam y por el creciente nicho de mercado de consumidores vegetarianos que ha impulsado la demanda de versiones vegetarianas de productos alimenticios.

Las enzimas recombinantes procedentes de microorganismos genéticamente modificados han demostrado ser excelentes sustitutos del cuajo animal, no obstante, países como Alemania y Países Bajos han prohibido su utilización por estar en contra de los alimentos modificados genéticamente (Roseiro y col., 2003).

1.2.3. Problemática actual del coagulante vegetal de *C. cardunculus*

La utilización de los coagulantes vegetales procedentes de las flores de cardo plantea una serie de problemas que dificultan la homogeneidad entre diferentes lotes en la fabricación de una misma variedad de queso.

Dado que no existe un protocolo estándar para el corte y el secado, la actividad del extracto de flor de cardo es extremadamente variable, y depende de la variedad, el estado de madurez, la porción de flor utilizada, el tiempo de secado y el contenido final de humedad (Freitas y col., 2000). Además, está demostrado que existe mucha variabilidad entre las plantas como consecuencia de diversos factores a parte de la variabilidad natural, como por ejemplo las condiciones climáticas y del suelo en la zona en la que crecen, lo que a su vez supone una variación a nivel composicional como el contenido de diferentes enzimas, la humedad de las flores y su composición química, pero también a nivel microbiológico. Todas estas variaciones entre una planta y otra implican una variabilidad en las características tanto morfológicas como organolépticas de un mismo tipo de queso (Barbosa, 1983; Heimgartner y col., 1990; Martins y col., 1996).

Por otro lado, algunos autores han observado que las flores que son recogidas en el campo que crecen de manera silvestre pueden ser una mezcla de diferentes especies como *Cynara cardunculus*, *Cynara humilis*, *Centaurea calcitrapa* y *Silybum marianum* (Sanjuán y Fernández-Salguero, 1994). Por lo que la utilización de esta mezcla de flores puede suponer un fraude en la elaboración de quesos con DOP como Queso de La Serena, Serra da Estrela, o Torta del Casar, cuyo reglamento exige que la procedencia de estas flores sea exclusivamente de la especie *Cynara cardunculus*.

A esto se le suman las observaciones de Fernández-Salguero y col. (1999) y de Gómez y col. (2001) que exponen los problemas sanitarios derivados de la utilización de extractos crudos acuosos de flores de cardo debido a un alto recuento de microorganismos viables totales, enterobacterias y bacterias coliformes. Esto llevó al desarrollo de un coagulante vegetal liofilizado con una mayor calidad microbiológica y que en la práctica demostró no afectar significativamente las características composicionales, bioquímicas y sensoriales típicas del queso elaborado con coagulante vegetal (Fernández-Salguero y col., 2002; Tejada y Fernández-Salguero, 2003).

1.2.4. Actividad coagulante

Uno de los parámetros más importantes para analizar en los coagulantes de la leche es la actividad enzimática o su fuerza. Para ello hay diferentes métodos, los

más antiguos y extendidos son el método Soxhlet y Berridge, y más recientemente se utilizan métodos internacionales estandarizados que han sido desarrollados y publicados conjuntamente por la Organización internacional de normalización, ISO por sus siglas en inglés y la federación láctea internacional, IDF por sus siglas en inglés (Jacob y col., 2011).

Un paso básico en la elaboración de la mayoría de los quesos es la coagulación de la leche por métodos enzimáticos, por lo que resulta esencial analizar la actividad coagulante y la cinética de la coagulación enzimática de los coagulantes para comprender su efecto sobre el proceso de coagulación de la leche y poder seleccionar aquellos más prometedores para utilizarlos en la fabricación de queso. El proceso de coagulación se puede dividir en tres fases diferentes pero que coinciden entre ellas: la hidrólisis de la κ -caseína que desestabiliza a las micelas de caseínas, la agregación de las micelas de caseínas y la gelificación (Dalglish, 1980). Concretamente, la actividad coagulante se mide como la capacidad de hidrólisis de la κ -caseína (Jacob y col., 2011), esto se debe a que las κ -caseínas se localizan principalmente en la superficie de las micelas con la parte hidrófoba de la para- κ -caseína unida a la micela y la parte hidrófila del caseinomacropéptido sobresaliendo en la solución, y la coagulación se produce cuando el coagulante hidroliza el sitio entre los aminoácidos 105 y 106 de la κ -caseína liberando el caseinomacropéptido y uniéndose las para- κ -caseínas formando una estructura de matriz tridimensional (Liu y col., 2021). Seguidamente, los iones de calcio neutralizan las cargas negativas de la superficie de las micelas lo que promueve la agregación de las micelas y por consiguiente la formación de la cuajada.

Los principales componentes proteicos de la leche son las α -, β -, y κ - caseínas (Jacob y col., 2011) por lo que cuando se evalúa un posible sustituto del cuajo es de suma importancia evaluar la degradación de las caseínas debido a sus efectos sobre el rendimiento quesero, la consistencia y el sabor del producto final (Shah y col., 2014). En este sentido, la acción hidrolítica sobre las κ -caseínas determinan el tiempo de coagulación y la calidad de los coagulantes, mientras que el nivel de hidrólisis de las α - y β - caseínas determinan el rango de aplicabilidad de los coagulantes y los tipos de queso (Liu y col., 2021). Los coagulantes vegetales procedentes de las flores de cardo de diversas especies han demostrado poseer actividad específica para el enlace Phe105-Met106 de la κ -caseína, aunque también

han demostrado una alta especificidad por otros enlaces peptídicos de las caseínas (Roseiro y col., 2003).

La estabilidad de las micelas de caseínas se ve afectada por factores como cambios de temperatura o de pH, el contenido en calcio, y la cantidad de coagulante (Horne, 1998), por esta razón, cuando se caracteriza la actividad coagulante de una enzima o coagulante resulta imprescindible estudiar el efecto de las variables intervinientes en la coagulación para establecer las condiciones óptimas que permitan obtener el mejor rendimiento y unas características fisicoquímicas y sensoriales adecuadas. Varios autores han observado que la actividad coagulante aumenta cuando aumenta la temperatura de la leche, la concentración enzimática y la concentración de calcio, y disminuye con el aumento del pH (Dalglish, 1980; Dalglish, 1983; Dalglish y Law, 1988).

La hidrólisis y la agregación de las micelas de caseína aumenta con el incremento de la temperatura hasta que la enzima se inactiva por calor. La temperatura óptima para la formación de la cuajada al pH natural de la leche (~pH 6,5) se sitúa en el intervalo de 34-38°C para la mayoría de los coagulantes comerciales. En la práctica, la coagulación suele hacerse a temperaturas de 30 a 35°C para tener un control adecuado de la firmeza de la cuajada en el momento del corte, y para dar al cultivo iniciador las condiciones adecuadas para la fermentación de la leche. La disminución del pH y el aumento de la temperatura de la leche posibilitan que a un menor grado de hidrólisis de κ -caseína ocurra la coagulación (Guinee y Wilkinson, 1992). Una disminución moderada del pH de la leche produce una solubilización moderada del calcio de las micelas de caseína, lo que conduce a una formación más rápida y a una cuajada más firme. Sin embargo, un mayor grado de solubilización del calcio conduce a una amplia desmineralización de las micelas de caseína, lo que da lugar a geles de cuajada más débiles y flexibles (Choi y col., 2007). La adición de cloruro cálcico (CaCl_2) a la leche disminuye el pH, reduce el tiempo de coagulación y acelera la formación de la cuajada. La adición de cloruro cálcico a la leche puede mitigar las alteraciones de la coagulación y la firmeza de la cuajada inducidas por el frío y el calor, y mejorar la leche que presenta una coagulación deficiente a causa de un bajo contenido en calcio. El efecto se debe probablemente a una combinación de la reducción de las fuerzas de repulsión tras la unión del calcio a las micelas de caseína, potenciando así las interacciones hidrofóbicas y un ligero descenso del pH que favorece la acción del coagulante y

aumenta la velocidad de agregación (Wedholm y col., 2006; Steffl y col., 1996; Horne, 1998). Se ha establecido una relación inversamente proporcional entre el tiempo de coagulación de la leche y la concentración enzimática (Dalglish, 1980). La agregación de las caseínas también depende del grado de hidrólisis enzimática de la κ -caseína llevada a cabo por el coagulante, lo que se traduce en que la velocidad de hidrólisis enzimática de la caseína de la leche es proporcional a la cantidad de cuajo añadida (Lomholt y col., 1998; Bauer y col., 1995)

1.2.5. Actividad proteolítica en leche y queso

La proteólisis es una de las reacciones bioquímicas más importantes y complejas que ocurren durante la maduración del queso y afecta a su textura, aroma y sabor. Tras la coagulación de la leche, las enzimas de los coagulantes que se quedan atrapadas en la matriz de la cuajada se denominan enzimas residuales o coagulante residual, y estas siguen hidrolizando las proteínas durante la maduración del queso (Figura I.4), liberando mayor cantidad de péptidos que ejercen funciones bioquímicas, reológicas y sensoriales en el queso (Ben Amira y col., 2017a; Fox, 1989). Los agentes proteolíticos que intervienen en este proceso son las enzimas coagulantes, las proteinasas y peptidasas endógenas de la leche, las enzimas de las bacterias iniciadoras y de las no iniciadoras, y de las proteinasas y peptidasas exógenas (McSweeney y Sousa, 2000). Este proceso se puede dividir en proteólisis primaria y proteólisis secundaria, en la primera el proceso se inicia por acción del agente coagulante residual y por las enzimas endógenas de la leche, generando péptidos de gran tamaño y de tamaño intermedio, en la segunda, las proteinasas y peptidasas de las bacterias iniciadoras y no iniciadoras hidrolizan los polipéptidos y péptidos formados durante la hidrólisis primaria dando lugar a péptidos pequeños y aminoácidos (Sousa y col., 2001).

El tipo de coagulante y su preferencia por ciertos enlaces van a influir notoriamente en los péptidos que se generen. Al comparar entre las cardosinas y la quimosina, se ha comprobado que las cardosinas son capaces de escindir todos los enlaces hidrófobos de las α_1 - y β -caseínas mientras que la quimosina únicamente actuaba sobre unos pocos, demostrándose así que las cardosinas presentan mayor preferencia por las regiones hidrófobas y por los enlaces entre residuos hidrofóbicos que la quimosina (Roseiro y col., 2003).

Entre los cambios sensoriales del queso a causa de la proteólisis, la textura es consecuencia de la proteólisis primaria durante la formación de la cuajada y el sabor amargo se origina con los péptidos pequeños e hidrófobos generados durante la hidrólisis secundaria. En cuanto al aroma, los péptidos sirven como substratos precursores para las proteinasas y peptidasas bacterianas que los transforman en péptidos más pequeños, aminoácidos libres y compuestos orgánicos volátiles; por otro lado, durante la masticación del queso se liberan también compuestos aromáticos (Tavaria y col., 2003).

La proteólisis también ejerce un efecto sobre el rendimiento quesero y depende del grado de hidrólisis de las caseínas y de la especificidad de la proteólisis por parte del agente coagulante. Así, los coagulantes con una actividad proteolítica moderada y altamente específica proporcionan un mayor rendimiento del queso (Ben Amira y col., 2017a).

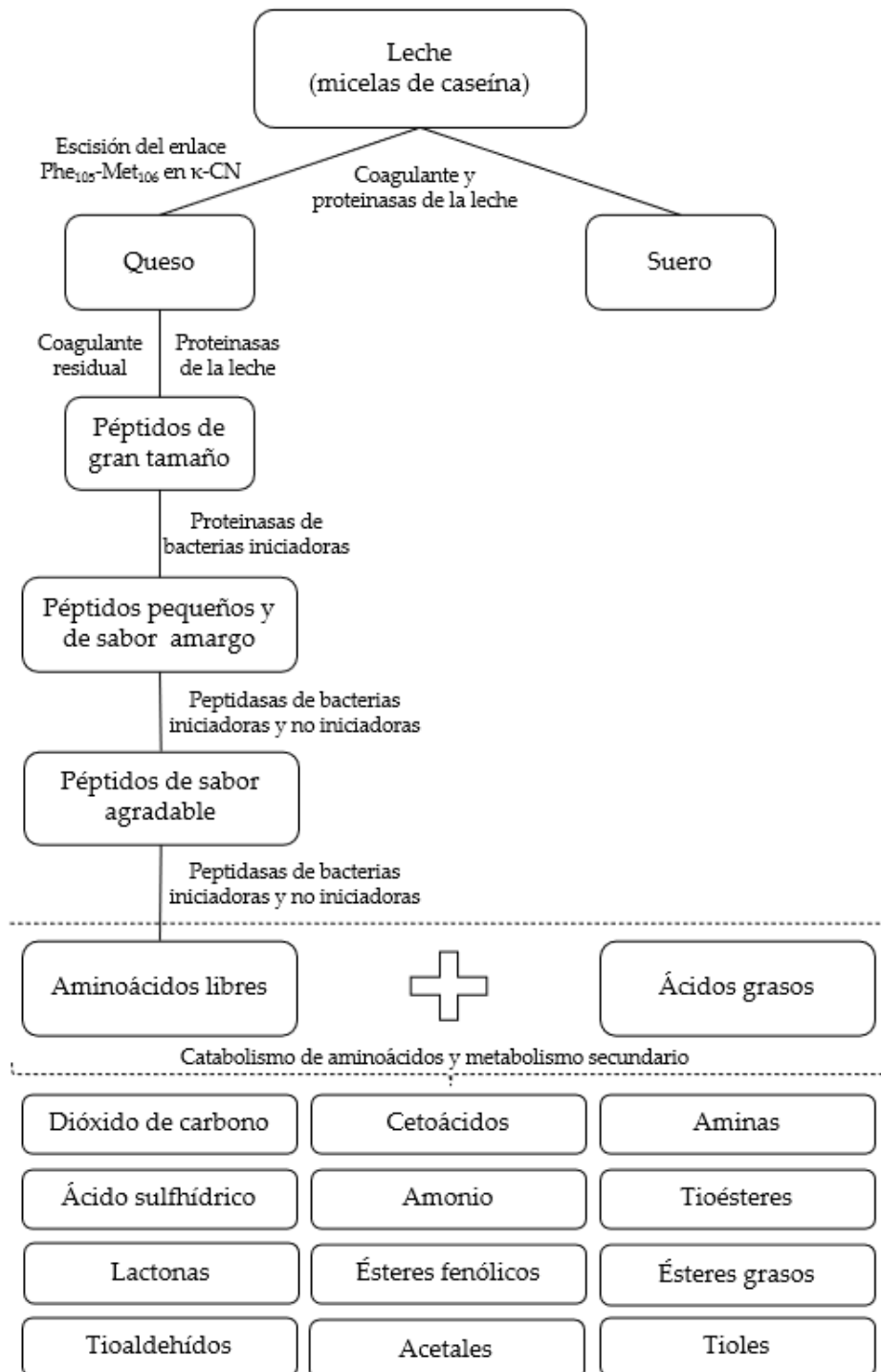


Figura 1.4 Hidrólisis de las caseínas de la leche y proteólisis del queso durante su maduración

1.2.6. Influencia del tipo de coagulante sobre las características fisicoquímicas y sensoriales del queso

La gran cantidad de variedades de queso se debe a sus diferencias en cuanto a su valor nutritivo, aspecto, sabor, textura y propiedades culinarias. En consecuencia, el queso es capaz de satisfacer una gama diversa de demandas sensoriales y nutricionales y, por lo tanto, tiene un atractivo muy amplio. Estas diferencias vienen determinadas por los dos principales cambios bioquímicos durante la maduración de los quesos, como lo son la lipólisis y la proteólisis, inducidas y condicionadas por el tipo de coagulante, la composición de la leche, la microflora del queso, las condiciones de temperatura, pH y humedad relativa durante su maduración, entre otras (Silva y Malcata, 2005; McSweeney y Sousa, 2000).

En este sentido, se ha comprobado que el nivel hidrolítico sobre las α -caseínas, β -caseínas y κ -caseínas de los agentes coagulantes influye en la calidad y las características del queso, por lo que las diferencias en cuanto a la capacidad proteolítica de cada coagulante pueden dar lugar a diferencias en las características organolépticas del queso (Ben Amira y col., 2017). Además, la cantidad añadida de los coagulantes influye en la actividad de hidrólisis residual por parte del coagulante residual que no se libera durante el desuerado y se mantiene dentro de la estructura de la cuajada, y desempeña un papel importante durante la maduración del queso. Así, por ejemplo, la mayoría de los péptidos hidrófobos se generan tras la hidrólisis de las α ₁- y β -caseínas por el coagulante residual durante la maduración del queso. Algunos autores demostraron que los péptidos hidrofóbicos están correlacionados con el sabor amargo y que los péptidos hidrofílicos y los aminoácidos con sabores agradables (Ben Amira y col., 2017a).

Esta hidrólisis residual afecta la fuerza y firmeza de la cuajada, en este sentido, una adición insuficiente de coagulante da lugar a una estructura poco consistente del queso, una gran pérdida de nutrientes y un bajo rendimiento quesero. Por el contrario, cuando la cantidad de coagulante es excesiva, la hidrólisis residual puede verse aumentada generando un fuerte sabor amargo durante la maduración del queso (Liu y col., 2021).

Tal y como se ha indicado con anterioridad, diferentes coagulantes muestran diversos niveles hidrolíticos de α -caseína, β -caseína y κ -caseína que conducen a las

diferencias en la proporción de nitrógeno soluble y nitrógeno no proteico en el nitrógeno total. El nitrógeno soluble de pH 4,6 refleja el contenido de péptidos pequeños y medianos en el queso, lo que representa la amplitud hidrolítica de la proteína. El nitrógeno no proteico refleja péptidos pequeños y cortos (2-20 residuos de aminoácidos), lo que representa la profundidad hidrolítica de la proteína (Walstra y col., 2001; Scott, 2002).

Se sospecha que la mayoría de los coagulantes derivados de plantas tienen una elevada actividad proteolítica, lo que da lugar a la generación de sustancias amargas y a limitaciones en la producción de queso (Liu y col., 2021). Varios estudios realizados sobre la hidrólisis de las caseínas por parte de los coagulantes vegetales observaron que presentan una mayor actividad proteolítica inespecífica y ejercen un mayor grado de hidrólisis sobre las α -caseínas y β -caseínas (Ben Amira y col., 2017a). Así, por ejemplo, se sugirió que algunos de los péptidos formados por la acción de las proteasas de algunos cardos, como las cardosinas, sobre las α 1- y β -caseínas quedaban retenidos en la cuajada debido a su elevada hidrofobicidad. A pesar de su bajo peso molecular estos péptidos pueden contribuir en gran medida al sabor amargo del queso. Otros péptidos (2000-4000 Da), formados debido a la elevada actividad proteolítica de la cardosina en el extremo C-terminal de las α 1- y β -caseínas, se pierden en el suero, lo que se traduce en un menor rendimiento quesero (Roseiro y col., 2003).

La textura del queso también se ve influida por el tipo de coagulante. La ruptura de las micelas de caseína en diversos polímeros por las diferencias en el grado de hidrólisis de los coagulantes permite que estos polímeros se agreguen, reorganicen y se combinen formando diversas estructuras. Lo mismo ocurre tras la hidrólisis de los péptidos de la caseína, liberándose diferentes cantidades de grupos amino, grupos carboxilo y otros grupos, que al combinarse con moléculas de agua dan lugar a diferentes estructuras y a diferentes capacidades de retención de agua y de actividad del agua, lo que se traduce en una textura significativamente diferente (Liu y col., 2021).

Según lo observado por Engel y col., 2000, los péptidos de alto peso molecular contribuyen en el desarrollo de la textura del queso, y tras su hidrólisis, se generan péptidos de cadena más cortas que contribuyen directamente en la formación del flavor del queso. También determinó que en los quesos de vaca predomina principalmente el gusto salado y amargo, en los de oveja el gusto humámico, y en

los de cabra humámico, amargo y la sensación astringente en la boca. Este sabor astringente desarrollado en algunos quesos se debe al aumento de las concentraciones de aminoácidos libres, resultante de la hidrólisis de péptidos.

1.3. ANÁLISIS SENSORIAL

1.3.1. Análisis sensorial en queso

La calidad de un queso finalmente se mide como el grado de aceptabilidad del producto para el usuario final. Para evaluar su calidad se miden criterios que proporcionan información sobre el producto como su composición, sus propiedades sensoriales y la aceptabilidad por parte del consumidor. Para ello es necesario el análisis mediante el empleo de métodos instrumentales o métodos sensoriales en los que el hombre es el instrumento de medida.

La textura del queso es un atributo sensorial compuesto ya que es el resultado de una combinación de propiedades físicas percibidas por los sentidos del tacto, la vista y el oído. Puede medirse indirectamente con técnicas reológicas como el análisis del perfil de textura empleando un texturómetro para realizar pruebas de compresión y/o punción en las muestras de queso y que nos dan a conocer características sensoriales como la fragilidad, triturabilidad, elasticidad, cohesividad, dureza y masticabilidad. En el caso de los quesos de pasta blanda puede resultar interesante el estudio de la viscosidad mediante un viscosímetro. Todos estos parámetros relacionados con la textura también pueden medirse mediante un panel sensorial entrenado, además de poder evaluar la sensación en boca como el carácter fundente, la gomosidad, sensación de crujiente, entre otros. Sin embargo, establecer un panel de catadores expertos entrenados es complicado y costoso.

El color del queso es una medida importante de calidad ya que los consumidores lo relacionan con parámetros como la frescura, madurez, deseabilidad y seguridad (McCraig, 2002; Jeliński y col., 2007). Los instrumentos de laboratorio (colorímetros) que miden el color transforman los espectros reflejados para producir coordenadas reproducibles del espacio de color. Es habitual medir el color de la cuajada y del queso durante el control de calidad del producto ya que, aunque diversos factores como la alimentación del ganado, la adición de

colorantes, y la variedad del queso pueden influir en su variación, este también se relaciona, por ejemplo, con defectos como el pardeamiento durante la maduración del queso (Carreira y col., 2002)

La puntuación de calidad mediante el análisis sensorial descriptivo sigue siendo el tipo de evaluación sensorial más utilizado en la industria quesera, donde se emplea para determinar la aceptabilidad o el rechazo en función de las puntuaciones obtenidas. De esta forma se clasifican los quesos según determinados parámetros como el aspecto, el sabor, el cuerpo y la textura, o defectos específicos como el amargor o aspecto moteado. Estas pruebas de clasificación se hacen mediante una escala con puntuaciones acordada con la finalidad de determinar el grado de aceptabilidad rechazo o aceptación del queso para mercados personalizados.

De esta forma el análisis sensorial descriptivo se utiliza principalmente como herramienta para el desarrollo de nuevos quesos ya que permite discriminar entre las características sensoriales de una gama de quesos y determinar la descripción cuantitativa de todas las diferencias sensoriales que puedan identificarse. Las características sensoriales se definen mediante un conjunto atributos acordados asignados por panelistas formados y cada atributo se puntúa en una escala lineal. Esta metodología también tiene potencial como herramienta de control de calidad, por ejemplo, en especialidades de quesos con DOP o IGP, siempre que se disponga de un queso estándar de calidad aceptable para compararlo con otras muestras (Scintu y col., 2010; Bord y col., 2021).

Para evaluar la aceptación por parte del consumidor se emplean técnicas afectivas las cuales pretenden conocer el grado de satisfacción del consumidor en relación con el producto final. Estas pruebas evalúan una reacción subjetiva por parte del panel de consumidores sobre el producto indicando si le gusta, lo acepta o lo prefiere, o si por el contrario lo rechaza, le disgusta, o no lo prefiere a otro (Anzaldúa-Morales, 1994). Sin embargo, la complejidad de estas pruebas radica en los diferentes aspectos que utilizan los consumidores para realizar sus elecciones alimentarias, existiendo así características intrínsecas como el color de la corteza o el número de ojos; y características extrínsecas como el precio, el origen, el proceso de producción o la información nutricional (Napolitano y col., 2010).

Así, se puede distinguir entre el "grado de excelencia" de los quesos, determinado por las pruebas de aceptación de los consumidores o los estudios de

mercado, y la "diferencia con respecto a un estándar", determinada por los paneles de consumidores entrenados. Aunque comúnmente, en la práctica, el queso es evaluado y clasificado por panelistas y personal de control de calidad para garantizar que su textura y sabor se ajustan a un consenso generalmente aceptado para la variedad en cuestión (Johnson y Law, 2010).

1.4. BIOACTIVIDAD DE PÉPTIDOS LÁCTEOS.

Los péptidos bioactivos son pequeños fragmentos de proteína (cadenas cortas de aminoácidos) que al liberarse tras la hidrólisis proteica son capaces de ejercer funciones biológicas, tales como actividad antihipertensiva, antioxidante, antimicrobiana, inmunomoduladora, antitrombótica, opioide, entre otras. Existen diversos métodos para producir péptidos bioactivos, sin embargo, el más común es la hidrólisis enzimática (Bueno-Gavilá y col., 2019).

La leche es el alimento más completo para el desarrollo de los mamíferos ya que es una fuente valiosa de componentes nutricionales. También es considerada un alimento funcional debido a que contiene una gran variedad de componentes bioactivos, que están relacionados con sus proteínas, como la caseína y las proteínas del suero. La producción de estos compuestos bioactivos surge tras la hidrólisis de las proteínas mediante su ingesta o durante la elaboración de productos derivados. De esta forma, la leche y los derivados lácteos además de satisfacer las necesidades nutricionales de los consumidores también desempeñan un papel importante en la prevención de trastornos de la salud (Punia y col., 2020; Jakopović y col., 2019).

El tipo de coagulante empleado influye en la formación de péptidos funcionales durante la maduración del queso y se debe a los diferentes sitios de escisión en las α -, β -, y κ -caseínas sobre los que actúa cada agente coagulante, generando una amplia variedad de péptidos de diferentes tamaños. En este sentido, Liu y col. (2021) sugiere que un queso elaborado con diferentes coagulantes podría estar repleto de varios péptidos bioactivos lo que conduciría al desarrollo de quesos funcionales.

Los coagulantes vegetales son conocidos por su alta capacidad caseinolítica y se relacionan con la alta producción de péptidos muy pequeños e hidrófobos durante la maduración del queso y que generan sabores amargos y restan firmeza a la pasta. Los quesos elaborados con enzimas procedentes de las flores de cardo

han demostrado una mayor proteólisis al generar más cantidad de péptidos hidrófobos, los cuales se han relacionado con una mayor bioactividad (Tejada y col., 2008c). Un extracto de *Cynara scolymus* L. ha demostrado su empleabilidad en la producción de hidrolizados de caseína ricos en péptidos bioactivos con diferentes actividades biológicas como inhibidores de la ECA, actividad antioxidante y actividad antimicrobiana (Bueno-Gavilá y col., 2019).

II – JUSTIFICACIÓN

II - JUSTIFICACIÓN

El cuajo animal se utiliza habitualmente en la industria láctea para cuajar la leche. Sin embargo, su uso puede estar limitado por motivos religiosos (por ejemplo, el judaísmo y el islam), la dieta (vegetarianismo) o la prohibición del cuajo animal recombinante en algunos países (por ejemplo, Alemania y los Países Bajos). Además, la preocupación suscitada tras la pandemia de EEB en el ganado ha reducido tanto la oferta como la demanda de cuajo animal tradicional derivado de estómagos de ganado bovino. La demanda de quesos "vegetarianos" por parte de los consumidores, así como la limitada disponibilidad y el elevado precio del cuajo animal, han suscitado un creciente interés por las fuentes vegetales y microbianas de enzimas coagulantes de la leche como posibles alternativas al cuajo animal. A esto se le suma la creciente preocupación de la población por el consumo de alimentos que cumplan el binomio alimentación-salud que ha suscitado la necesidad de diseñar y producir alimentos o ingredientes funcionales.

Las proteasas vegetales se utilizan desde hace siglos como coagulantes de la leche en la fabricación de quesos: la referencia más antigua se atribuye a Lucius Junius Columella en su tratado *De re rustica* (50 a.C.). Estas enzimas son principalmente constituyentes de hojas o flores, a veces de látex y/o savia, frutos, raíces o semillas. Las enzimas de las flores y hojas del género *Cynara* L. constituyen el coagulante vegetal más utilizado en la fabricación de queso, y también el más investigado (Roseiro y col., 2003). Casi todas las enzimas utilizadas como coagulantes de la leche pertenecen a las proteasas aspárticas, pero también se han descrito enzimas de otros grupos, como las proteasas de cisteína y serina las cuales han demostrado que poseen la capacidad de coagular la leche en condiciones adecuadas (Shah y col., 2014). La excesiva naturaleza proteolítica de la mayoría de los coagulantes vegetales ha limitado su uso en la fabricación de queso debido a los menores rendimientos de queso, sabores amargos y defectos de textura. La búsqueda de nuevas enzimas con actividad potencial coagulante de la leche a partir de plantas aún continúa con el fin de satisfacer la creciente demanda mundial de una producción de queso diversificada y de buena calidad (Shah y col., 2014).

Para la fabricación de queso con coagulantes vegetales, extractos acuosos crudos se preparan tradicionalmente a partir de plantas herbáceas perennes

espontáneas, nativas de la zona mediterránea occidental y central, comúnmente denominadas "cardos". El término "cardo" se utiliza generalmente para plantas espinosas pertenecientes a la tribu Cynareae (sinónimo: Cardueae), especialmente los géneros *Carduus*, *Cirsium* y *Onopordum*. La misma tribu incluye también los siguientes géneros: (i) *Cynara*, con las especies *C. cardunculus* L. (cardo silvestre) y *C. scolymus* L. (alcachofa); (ii) *Carlina* (carlina cardo); (iii) *Silybum* (cardo mariano); (iv) *Onopordum* (cardo algodónero) y otras.

Hasta la fecha, se han realizado algunos estudios sobre extractos acuosos crudos derivados de algunas especies de cardos (especialmente *C. cardunculus* y *C. scolymus*) utilizados para la coagulación de la leche; sin embargo, la mayoría de las propiedades, incluidos los rasgos nutricionales y nutracéuticos de los extractos de estas especies de cardo, aún no se han descrito por completo (Roseiro y col., 2003). Diversos estudios realizados sobre extractos de hojas tanto de alcachofa (*C. scolymus* L.) como de cardo (*C. cardunculus* L.) revelaron la presencia de compuestos biológicos de alto valor, especialmente polifenoles (derivados cafeoilquínicos), con conocidos efectos beneficiosos para la salud humana. Estos extractos también mostraron actividades antioxidantes, antibacterianas, antiVIH, expelentes de la bilis, hepatoprotectoras, coleréticas, así como la capacidad de inhibir la biosíntesis del colesterol y la oxidación del colesterol LDL (Christaki y col., 2012).

Las especialidades de queso cuajadas con coagulantes de cardo se elaboran generalmente en explotaciones lecheras familiares o artesanales, situadas la mayoría de las veces en zonas marginales (pastos de altura, tierras áridas y secas, islas, etc.), utilizando leche cruda de oveja o de cabra o una mezcla de ambas. Los estudios realizados hasta la fecha han demostrado que los extractos de cardo contienen varias proteasas con diferentes propiedades enzimáticas. Los antiguos procedimientos de preparación de estos extractos suelen transmitirse de padres a hijos durante generaciones; se basan en la recolección manual de hojas frescas o flores (cabezas) de cardos silvestres. La adición de los extractos crudos acuosos de cardo aumenta la carga microbiana de la leche y de la cuajada, razón por la cual en los últimos años se ha optado por la liofilización previa de estos extractos ya que no solo no alteran la carga microbiana del queso, sino que también aumenta la vida útil de estos coagulantes (Tejada y col., 2008a).

La utilización de los coagulantes vegetales de cardo en la producción de quesos de leche de cabra no está extendida, y mucho menos en quesos con

Denominación de Origen Protegida (DOP). Respecto al queso de Murcia al vino, se ha evaluado la empleabilidad de un coagulante vegetal liofilizado de *Cynara cardunculus* en su producción (Tejada y col., 2008b), sin embargo, no se han explorado otras especies de cardo con la finalidad de encontrar el agente coagulante más adecuado como sustituto del cuajo animal para la elaboración de versionas vegetarianas de este queso para su diversificación en el mercado, así como tampoco han sido estudiadas las preferencias y aceptación por parte de los consumidores.

El empleo de los extractos de cardo para la elaboración de productos o ingredientes alimenticios con alto contenido en péptidos bioactivos ha llevado a estudiar hidrolizados de caseína de extractos de cardo de la especie *Cynara scolymus* (Bueno-Gavilá y col., 2020) que demostraron contener péptidos con capacidades potencialmente beneficiosas para la salud.

Por tales motivos, esta tesis doctoral se centra en la caracterización tecnológica de las nuevas especies de cardo *Onopordum tauricum*, *Onopordum platylepis* y *Cynara humilis* para el desarrollo de versiones vegetarianas del queso Murcia al vino con efectos potencialmente beneficiosos para la salud debido a la mayor generación de péptidos hidrófobos en el queso, por acción de las proteasas vegetales de estas especies de cardo, y que se relaciona con una mayor generación de péptidos bioactivos; cubriendo así la demanda de dos nichos de mercado crecientes como el de los alimentos vegetarianos y de alimentos y/o ingredientes funcionales.

III – OBJETIVOS

III - OBJETIVOS

Esta memoria de tesis doctoral tiene como **objetivo principal** la obtención de nuevas versiones de queso Murcia al vino aptas para vegetarianos y consumidores con otras restricciones ideológicas y religiosas mediante la utilización de coagulantes vegetales.

La consecución de este objetivo se logra a través de los siguientes **objetivos específicos**:

1. Caracterización de la actividad coagulante y proteolítica de extractos crudos liofilizados de las especies de cardo *Cynara humilis*, *Onopordum tauricum* y *Onopordum platylepis* para su empleo como agentes coagulantes de leche de diferentes especies.
2. Evaluar la capacidad de los extractos crudos liofilizados de cardo para la fabricación de diferentes versiones vegetarianas del queso de Murcia al vino elaborado tradicionalmente con cuajo animal.
3. Estudiar el efecto de los nuevos extractos de *Cynara humilis* y *Onopordum platylepis* sobre las características químicas, fisicoquímicas, bioquímicas, microbiológicas, y sensoriales del queso de Murcia al vino.
4. Evaluar las preferencias y aceptación de los consumidores hacia una nueva variedad de queso de Murcia al vino elaborado con coagulante vegetal.
5. Identificar las secuencias de péptidos de los hidrolizados de caseína bovina obtenidos con los extractos vegetales de *Cynara cardunculus*, *Cynara humilis* y *Onopordum platylepis* y determinar su potencial bioactividad.

IV - MATERIAL Y MÉTODO

IV -MATERIAL Y MÉTODO

4.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Para el desarrollo de los objetivos planteados en este trabajo se emplearon varios tipos de coagulantes de la leche: cuajo animal, coagulante vegetal comercial, coagulante vegetal crudo líquido y coagulantes vegetales crudos liofilizados.

El cuajo animal líquido comercial es de procedencia ovina de las razas Churra y Castellana y fue suministrado por Cuajos Caporal (Valladolid, España) y se identifica como AR. El coagulante líquido vegetal comercial utilizado está elaborado con la especie de cardo *Cynara cardunculus* L. y fue suministrado por Dairy and Food S.R.L. (Bolonia, Italia) y se denomina COM. El coagulante procedente de la mezcla del cuajo animal y el coagulante vegetal de la especie *Onopordum platylepis* Murb. de crecimiento espontáneo se denominó AR/OP y se preparó mezclando 1,5 mL de cuajo animal con 50 mL de extracto liofilizado de *Onopordum platylepis* Murb. reconstituido en agua mineral sin cloruros a una concentración de 20 mg de extracto por mL de agua.

El coagulante vegetal crudo líquido se elaboró a partir de flores secas de cardo de la especie *Cynara cardunculus* L. de crecimiento espontáneo mediante la maceración de 12 gramos de flores en 100 mL de agua mineral sin cloruros y se identifica como CC. Los coagulantes vegetales crudos liofilizados se elaboraron a partir de las especies de cardo tanto de crecimiento espontáneo (Figuras IV.1 y IV.2) como cultivadas de *Cynara humilis* L., *Onopordum tauricum* Willd., *Onopordum platylepis* Murb. y se identificaron como CH (*Cynara humilis* silvestre), OTS (*Onopordum tauricum* silvestre), OTC (*Onopordum tauricum* cultivado), y OP (*Onopordum platylepis* silvestre).

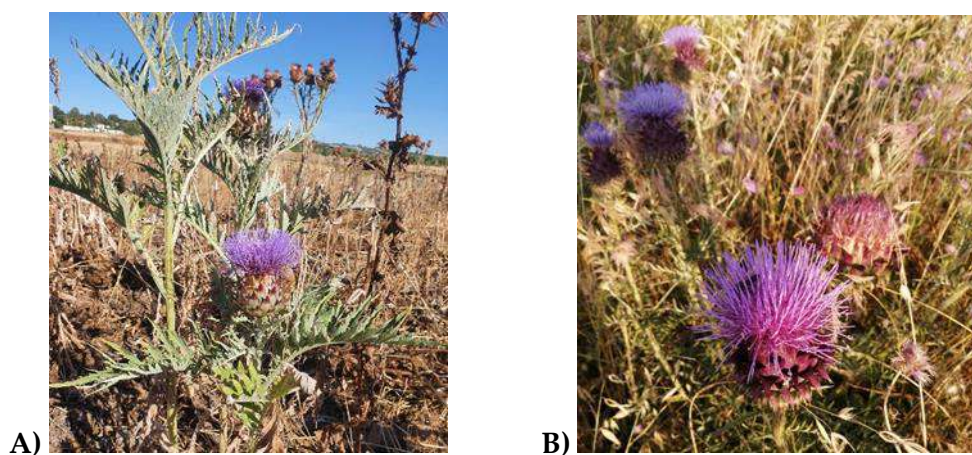


Figura IV.1 Plantas de las especies A) Cynara cardunculus L. B) Cynara humilis L.

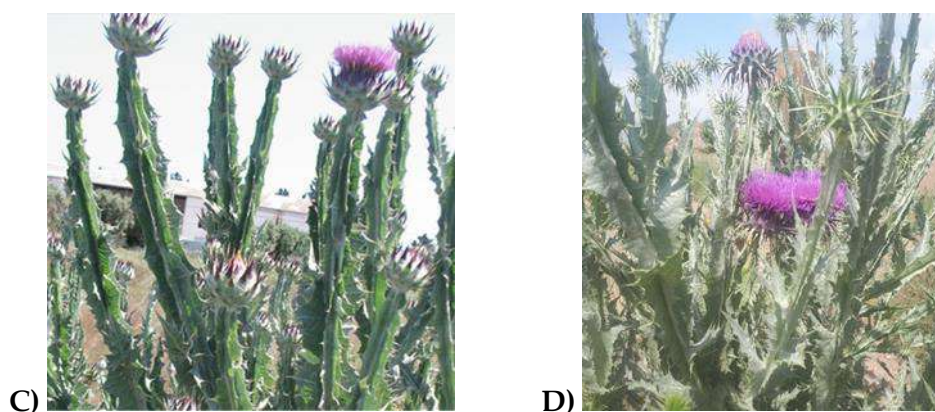


Figura IV.2 Plantas de las especies C) Onopordum platylepis Murb. D) Onopordum tauricum Willd.

4.1.1. Toma de muestras de cardos de diferentes especies

Las muestras fueron recogidas entre los meses de mayo y julio en el estado de maduración de plena floración en las localidades de: Cáceres, Extremadura, España; Susa, Túnez, África; Ancona, Región de las Marcas, Italia; Visso, Región de las Marcas, Italia (Tabla IV.1). Las flores fueron llevadas al laboratorio de

investigación de la Universidad Católica San Antonio de Murcia donde fueron aislados los estilos y estigma del resto de la flor.

Tabla IV.1 Localizaciones de recolección de las muestras de cardo

Espece	Tipo de crecimiento ¹	Localización ²
<i>Cynara cardunculus</i>	a	L1 Cáceres, Extremadura, España
<i>Cynara humilis</i>	a	L2 Cáceres, Extremadura, España
<i>Onopordum platylepis</i>	a	L3 Susa, Túnez, África
<i>Onopordum tauricum</i>	b	L4 Ancona, Región de las Marcas, Italia
<i>Onopordum tauricum</i>	a	L5 Visso, Región de las Marcas, Italia

¹a: crecimiento espontáneo; b: cultivadas

²Coordenadas geográficas: L1: 39° 26' 19,40" N 6° 22' 52,95" W, L2: 39° 35' 31,47" N 6° 23' 30,03" W, L3: 35° 91' 6.738" N 10° 56' 2.078" E, L4: 43° 32' N 13° 22' E. L5: 42° 59' 56.8" N 13° 06' 53.5" E

4.1.2. Preparación del extracto acuoso liofilizado

La preparación de los extractos acuosos liofilizados de las flores de cardo (Figura IV.3) se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Tejada y Fernández-Salguero (2003) mediante el cual, los estilos y estigmas de las flores de cardo son macerados en agua destilada en una proporción 1:10 (p/v) a temperatura ambiente en un lugar fresco y seco durante 24 horas. Transcurrido este tiempo el extracto acuoso obtenido fue tamizado y centrifugado a 3000x g durante 5 minutos. El sobrenadante obtenido se filtró con papel Whatman N° 1 y se mantuvo en congelación a -32°C durante 24 horas. Tras la congelación, se procedió a liofilizar utilizando un equipo Christ Alpha 1-2 LD plus (Osterode am Harz, Alemania) a una presión de trabajo entre 4 y 13 Pa. El polvo obtenido tras la liofilización fue almacenado a -20°C hasta su utilización.



Figura IV.3 Preparación de los extractos liofilizados de cardos.

4.1.3. Purificación enzimática

Este análisis se llevó a cabo en los laboratorios del Departamento de Ciencias Agrarias, Alimentarias y Medioambientales de la Universidad Politécnica de las Marcas, Ancona, Italia. Para la purificación de las enzimas procedentes de las muestras de cardo recolectadas se utilizaron aproximadamente 15 gramos de los estilos y estigmas previamente separados de las plantas y se homogeneizaron con el equipo Ultra-turrax® IKA-Werke (GmbH & Co., Staufen, Alemania) en un tampón de acetato sódico 0,1M pH 5,5 (tampón A) en un ratio de concentración 1:5, manteniendo una velocidad de 20000 rpm durante 2 minutos, repitiéndose el procedimiento hasta cuatro veces con dos minutos de intervalo en hielo. El homogeneizado fue centrifugado a 11000x g durante 30 minutos a 4°C y el sobrenadante obtenido se saturó al 60% con sulfato de amonio. Tras agitar durante 20 minutos a 4°C, se repitió la centrifugación bajo las mismas condiciones anteriores. El precipitado se resuspendió con 6 mL del tampón A y se centrifugó tal y como se ha indicado anteriormente. El sobrenadante se desaló utilizando una

columna PD-10 con resina Sephadex G25 (GE Healthcare, Chicago, IL, EE.UU) equilibrada y eluida con un tampón de acetato sódico 0,025 M pH 5,5 (tampón B). Una alícuota de 1 mL de la muestra resultante se cargó a en una columna Mono Q (GE Healthcare, Chicago, IL, EE.UU) equilibrada con el tampón B. Tras un lavado con el mismo tampón la elución se llevó a cabo con un gradiente lineal de cloruro sódico de 0 a 0,5 M en tampón B. En un proceso de elución alternativo, después del paso de lavado con el tampón B con cloruro sódico 0,15 M la elución se llevó a cabo con un gradiente lineal de cloruro sódico desde 0,15 hasta 0,3 M en el tampón B. La preparación final se almacenó a -20°C hasta su utilización.

Las enzimas extraídas del procedimiento anterior se analizaron mediante las técnicas SDS-PAGE y Tricine SDS-PAGE, siguiendo las condiciones de electroforesis descritas por Laemmli (1970) y Schägger (2006), respectivamente.

4.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES TECNOLÓGICAS DE LOS COAGULANTES VEGETALES

4.2.1. Determinación del contenido proteico

La concentración total de proteína de los extractos acuosos liofilizados de las muestras de cardo se determinó siguiendo el método de Bradford (1976) utilizando el reactivo de Bradford (Sigma-Aldrich, Milán, Italia).

Se realizó una recta de calibrado utilizando soluciones de seroalbúmina bovina (Merck, Darmstadt, Alemania) a concentraciones de 0,1 hasta 1 mg/mL. En tubos de ensayo se añaden 500 µL de reactivo de Bradford y 500 µL de solución de seroalbúmina bovina, se agitan y se incuban en oscuridad durante 5 minutos. Se midió la absorbancia a 595 nm con un espectrofotómetro UV-1800 Shimadzu (Kyoto, Japan).

Los extractos acuosos liofilizados fueron reconstituidos en agua destilada a distintas concentraciones (Figura IV.4) y cada concentración se midió por triplicado.



Figura IV.4 Determinación del contenido en proteína mediante método Bradford

4.2.2. Caracterización de la actividad coagulante

La evaluación de la actividad coagulante se llevó a cabo siguiendo diversas metodologías mediante las cuales el tiempo de coagulación se determinó visualmente al detectar los primeros signos de coagulación (flóculos) en las paredes del tubo de ensayo (Figura IV.5).

Para la caracterización de la actividad coagulante de los extractos liofilizados de cardo se siguió el método estándar de la International Dairy Federation (IDF), 1987, empleando 10 mL de leche descremada en polvo bovina reconstituida a una concentración de 0,12 kg/L como sustrato y añadiendo 0,1 mL de coagulante. El efecto de las variables independientes de concentración de extracto (5-40 mg/mL), temperatura (T) en un rango de 20-85°C, pH (5-8), y concentración de CaCl₂ ([CaCl₂]) en un rango de 5-70 mM, sobre el desempeño de la actividad coagulante de los extractos Para el cálculo de la actividad coagulante de la leche (MCA) se utilizó la ecuación 1.1 propuesta por Mozzon (2020) que define una unidad coagulante como el volumen de leche que puede ser coagulado por una unidad de volumen de coagulante en 40 minutos bajo condiciones definidas de T, pH y [CaCl₂]:

$$MCA (U/mL) = (2400 * M)/(S * V) \quad (1.1)$$

siendo M el volumen de leche (mL), S el tiempo de coagulación (segundos), y V el volumen de coagulante (mL).

Para la optimización de la actividad coagulante de los extractos liofilizados de cardo, se utilizó la metodología de superficie de respuesta (RSM), que permitió evaluar las interacciones entre los parámetros de T, pH y $[CaCl_2]$, que intervienen en la coagulación, así como calcular las condiciones de coagulación óptimas para cada tipo de extracto. Como sustrato se empleó leche cruda descremada y liofilizada de oveja y de cabra ya que son el tipo de leche que se utilizarán en la elaboración de los diferentes tipos de queso. La leche se reconstituyó según el contenido en materia seca de cada una de ellas. Los coagulantes fueron añadidos a la leche en proporción 1:10 (v/v).



Figura IV.5 Determinación de la actividad coagulante de la leche.

4.2.3. Caracterización de la actividad proteolítica

La actividad proteolítica (PA) de los extractos liofilizados de cardo se determinó siguiendo dos métodos.

Siguiendo el método descrito por Silva y Malcata (2005), se utilizó como sustrato caseína de leche bovina, libre de carbohidratos y ácidos grasos (Calbiochem, Darmstadt, Alemania) al 1% (p/v) en tampón citrato 10 mM (pH 6,2) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) con 0,03% (p/v) de azida sódica (Fisher Scientific, Madrid, España) para evitar el crecimiento microbiano, y se incubó en

baño a 32°C. La hidrólisis se inició añadiendo 0,12 mL de extracto reconstituido a diferentes concentraciones (5, 10, 20, 30 y 40 mg de extracto liofilizado/mL) a 3 mL de solución de caseína. Posteriormente, se muestrearon alícuotas de 0,5 mL a diferentes tiempos (5, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos). La reacción enzimática se inactivó a 100°C durante 5 minutos, y la PA se cuantificó mediante la evaluación de los péptidos solubles en ácido tricloroacético (TCA) al 5% (p/v) (Sigma-Aldrich, Misuri, EE.UU.). Para ello, se añadió 1 mL de TCA al 5% (p/v) y se incubó durante 10 minutos a 25°C. Se centrifugó a 12.000x g durante 10 minutos, y la absorbancia del sobrenadante se midió a 280 nm en una cubeta de cuarzo.

Adaptando del método de Twining (1984), se midió la PA de los extractos liofilizados mediante fluorescencia continua con caseína-isotiocianato de fluoresceína (caseína-FITC). Para la reacción se mezclaron tampones de acetato de sodio 40 mM (pH 5,0, 5,5, y 6,0), 0,1 mg/mL de caseína-FITC tipo III bovina, y cloruro cálcico 5, 10 y 15 mM en un volumen final de 200 µL. Tras la adición de la muestra (1 µg), se mide continuamente la fluorescencia a 35, 40 y 45°C, utilizando un lector de microplacas Synergy HT equipado con filtros de excitación y emisión de 485 y 528 nm, respectivamente. Una unidad de fluorescencia (FU) se definió como la cantidad de enzima que produce un aumento de 1 unidad de fluorescencia por minuto en las condiciones del ensayo. El ensayo basado en caseína-FITC también se utilizó para controlar la purificación de la proteasa y caracterizar la enzima purificada. También se ensayaron los efectos del pH y T sobre la PA de la enzima purificada utilizando Na-caseinato de leche bovina como sustrato. Para ello, la enzima pura se incubó con caseinato al 2% (p/v) en tampón fosfato sódico 0,1 M a los valores de pH y T indicados. A diferentes tiempos se tomaron alícuotas y se detuvo la reacción añadiendo TCA al 5% en proporción 1:2 (v/v). Tras centrifugar a 16000x g durante 5 minutos, se midió la absorbancia del sobrenadante a 280 nm y se calculó la velocidad inicial de la reacción. Se definió una unidad caseinolítica (UC) como la cantidad de enzima que produce un aumento de una unidad de absorbancia por minuto a 280 nm en las condiciones del ensayo.

4.2.4. Evaluación de las propiedades reológicas de los geles

Para el análisis de la cinética de la coagulación y las propiedades tecnológicas de los geles se empleó como sustrato leche cruda de oveja de la raza Churra y leche

de cabra de la raza Murciano-Granadina ambas procedentes del Centro Integrado de Formación Profesional Viñalta (Junta de Castilla y León, Palencia, España). La leche empleada se obtuvo del tanque de leche y procedía del ordeño de un mismo día.

En primer lugar, se pesaron 200 gramos de leche y se calentaron hasta la temperatura del ensayo (32°C) empleado un baño termostático F38-HL (Julabo, Alemania). Una vez alcanzada la temperatura se añadieron 2,3 mM de cloruro cálcico (Panreac, Barcelona, España) y, a continuación, se añadieron los coagulantes. Las dosis empleadas de cada coagulante fueron calculadas para que el tiempo de floculación (RCT) fuese el mismo en todos los casos. Tras la adición de los distintos coagulantes se procedió a una agitación ligera durante 30 segundos garantizando su mezcla completa. Posteriormente, se tomaron 18 mL y se introdujeron en el sistema copa/cilindro (CC27/T200/AL, Anton Paar, Austria) del reómetro (Physica MCR 301, Anton Paar, Austria) a temperatura controlada de 32°C para llevar a cabo el test de coagulación. Se aplicó una oscilación constante sobre la muestra a un 0,5% de porcentaje de deformación y una frecuencia de 1 Hz. Se monitorizó el módulo elástico (G') y el módulo viscoso (G'') durante 30 minutos en el caso de oveja y 40 minutos en el caso de cabra, trabajando en la región viscoelástica de los geles. El análisis de la curva de firmeza (G' vs tiempo) y su primera y segunda derivada, para obtener los parámetros de coagulación se realizó siguiendo el método de Frederiksen y col. (2011), mediante el empleo del software Rheoplus 3.62 (Anton Paar, Austria). Los parámetros de la curva de coagulación analizados fueron los siguientes:

- Tiempo de coagulación (RCT) o tiempo en el que se alcanzan los primeros flóculos, calculado como el punto de corte entre las curvas G' y G'' .

- Velocidad máxima de formación del gel (CFR), calculado como la pendiente de la curva G' vs t en el máximo de la primera derivada (1D). En este punto se calculan las coordenadas de tiempo (MAX_{1D}) y firmeza (G'_{CFR})

- Para conocer mejor los cambios experimentados, se dividió la zona que engloba los mayores cambios en la cinética de coagulación en tres intervalos de tiempo los cuales se calcularon mediante las ecuaciones 1.2, 1.3, y 1.4 a partir de RCT y los tiempos en los que se alcanzó el máximo de la primera derivada, y el máximo y mínimo de la segunda derivada (2D) de la curva G' vs t :

$$t_0 = MAX_{2D} - RCT \quad (1.2)$$

donde t_0 es el tiempo de inicio de la agregación tras la hidrólisis, MAX_{2D} es el tiempo máximo de la segunda derivada y RCT es el tiempo de coagulación.

$$t_I = MAX_{1D} - MAX_{2D} \quad (1.3)$$

siendo t_I el intervalo de velocidad de agregación creciente o zona de agregación primaria, MAX_{1D} es el tiempo máximo de la primera derivada y MAX_{2D} es el tiempo máximo de la segunda derivada.

$$t_{II} = MIN_{2D} - MAX_{1D} \quad (1.4)$$

donde t_{II} es el intervalo de velocidad de agregación decreciente o zona de agregación secundaria, MAX_{1D} es el tiempo máximo de la primera derivada y MIN_{2D} es el tiempo máximo de la segunda derivada

- Firmeza del gel al final del ensayo (G'_F)

Para la realización de la capacidad de retención de agua (WHC) y de la composición del suero se partió de la muestra inicial tras la adición de los distintos coagulantes y su agitación, realizándose simultáneamente a la toma de muestra del reómetro. Para ello se tomaron 3 alícuotas de 50 mL y se mantuvieron en un baño termostático a 32°C. Cuando los geles formados alcanzaron una firmeza determinada (170 Pa en oveja y 40 Pa en cabra), la cual aseguraba haber superado el punto de máxima velocidad (G'_{CFR}), las muestras se sacaron del baño e inmediatamente fueron refrigeradas a 4°C. Pasadas 24 h, se centrifugaron a 4000x g durante 10 minutos a 5°C siguiendo el método descrito por Nassar y col. (2020). Se pesó tanto la cuajada inicial como el sobrenadante obtenido tras la centrifugación y la capacidad de retención de agua (WHC) se calculó siguiendo la ecuación 1.5 propuesta por Vianna y col. (2017):

$$WHC (\%) = 100 \left(\frac{Y-DW}{Y} \right) \quad (1.5)$$

donde Y es el peso de la cuajada y DW es el peso del sobrenadante.

Se analizó el contenido en materia grasa, proteína total, y nitrógeno no proteico en forma de urea del sobrenadante (suero) obtenido tras la centrifugación mediante el equipo CombiFoss7 instrument (FOSS, Hilleroed, Denmark) calibrado específicamente para suero.

4.2.5. Evaluación de las propiedades moleculares y enzimáticas de las proteasas purificadas

Se utilizó la técnica de cromatografía de filtración en gel para estimar la masa molecular de la preparación final de la enzima purificada, obtenida según lo descrito en el apartado 4.1.3 de esta memoria de Tesis Doctoral, empleando una columna Superose 12 10/300 GL (GE Healthcare, Chicago, IL, EE.UU.). Este análisis se llevó a cabo en los laboratorios del Departamento de Ciencias Agrarias, Alimentarias y Medioambientales de la Universidad Politécnica de las Marcas, Ancona, Italia.

La columna fue equilibrada y eluida con un tampón de acetato sódico 25 mM pH 5,5 que contenía 0,3 M NaCl. El efecto del pH y la temperatura sobre la actividad proteolítica de la enzima purificada se evaluó utilizando como sustrato caseinato bovino y caseína bovina-FITC. Para la estabilidad térmica, la proteasa purificada se incubó a 45°C y 55°C. La actividad residual se midió mediante el ensayo caseína-FITC a pH 5,5 y 37°C. El efecto de inhibidores conocidos de proteasas sobre la actividad proteolítica se evaluó preincubando la enzima purificada durante 30 minutos a 37°C en presencia de 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 0,1 mM de pepstatina A, o 0,1 mM de E-64. La actividad residual se midió con el ensayo caseína-FITC a pH 5,5 y 37°C.

Para analizar la actividad proteolítica de la enzima pura sobre α -caseína (α -CN), β -caseína (β -CN), y κ -caseína (κ -CN) bovinas comerciales (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) se disolvieron en tampón fosfato sódico 0,1 M pH 6,2 y se incubaron con la enzima purificada. Se incubaron con la enzima purificada o con cuajo de ternera como control, a 37°C durante 60 minutos. Las mezclas consistieron en 0,7 mg/mL de cada caseína y 0,01 mg/mL de enzima o cuajo animal. Después de 0 y 60 minutos de incubación, las alícuotas se sometieron a electroforesis SDS-PAGE en gel de acrilamida al 15%.

4.3. ANÁLISIS DE PROPIEDADES BENEFICIOSAS PARA LA SALUD DE LOS CARDOS

4.3.1. Determinación del contenido en minerales

Se determina el contenido de Ca, P, Na, K, Mg, Zn y Mn según los métodos de la A.O.A.C (2002).

Para ello, 0,3 gramos de muestra fueron incinerados y seguidamente se solubilizaron en 1 mL de HNO₃ concentrado al 65%. Se ajustó a un volumen final de 50 mL a una concentración final de 1% (v/v) con CsCl al 0,1% (p/v), para evitar la ionización de sodio y potasio, y con LaCl₃ al 0,1% (p/v) para la detección de Ca y Mg.

Los minerales Ca, Na, K, Mg, Zn y Mn fueron detectados mediante un espectrofotómetro de absorción atómica modelo A. Analyst 300 (Perkin Elmer, Norwalk, EE.UU). Mientras que el P fue determinado mediante espectrofotometría a 400 nm utilizando el equipo UV-1800 Shimadzu (Kyoto, Japan).

4.3.2. Preparación de hidrolizados de caseína

Se prepararon hidrolizados de caseína bovina al 1% (p/v) a un pH de 6,2 siguiendo el procedimiento descrito por Bueno-Gavilá y col. (2020). Alícuotas de 9mL de la solución de caseína se calientan en un baño María a 50°C manteniendo agitación constante. Una vez que la solución de caseína alcanzó la temperatura fijada, se añadieron 360 µL de los extractos liofilizados de cardo, elaborados según lo descrito en el apartado 4.1.2 de esta memoria de Tesis Doctoral, reconstituidos en agua destilada a una concentración de 40 mg/mL.

Tras 16 horas, se detuvo la reacción aumentando la temperatura a 100°C durante 5 minutos. Se disminuyó el pH a 4,6 y seguidamente se centrifugó a 4000x g durante 20 minutos. El sobrenadante se filtró con filtros de Nylon 0,45 µm y al filtrado obtenido se ajustó el pH a 7,0 y se congeló hasta su utilización.

4.3.3. Bioactividad de los hidrolizados de caseína

La identificación se determinó mediante análisis de espectrometría de masas (MS) en tándem utilizando cromatografía nano líquida siguiendo el método

descrito por Bueno-Gavilá y col. (2019) y se realizaron en el laboratorio de Unidad de Proteómica y Bioinformática de la Universidad de Córdoba, España.

Para ello se tomaron alícuotas de los hidrolizados de caseína bovina, elaborados según el apartado 4.3.2 de la memoria de esta Tesis Doctoral, y se liofilizaron y mantuvieron en congelación hasta su utilización. La cuantificación de los péptidos se llevó a cabo mediante nanocromatografía líquida utilizando un equipo Dionex UltiMate™ 3000 nano UHPLC (Thermo Scientific, Massachusetts, EE.UU.).

En un paso previo se eluyen las muestras durante 5 minutos en una precolumna Acclaim™ PepMap™ (300 μm x 5 mm, Thermo Scientific, Massachusetts, EE.UU.) en una mezcla de acetonitrilo al 2% y ácido trifluoroacético (TFA) al 0,05% a un flujo constante de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Se separaron los péptidos utilizando una columna Acclaim™ PepMap™ C18 (75 μm x 50 cm, Thermo Scientific, Massachusetts, EE.UU.) a una temperatura constante de 40°C durante 85 minutos. Para la separación cromatográfica se utilizaron dos solventes, el solvente A) 0,1% de ácido fórmico en agua, y el solvente B) 0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo 20% con un flujo de 300 nL/min. La configuración de los gradientes utilizados para la separación de los péptidos se muestra en la tabla IV.2

Tabla IV.2 Programa de gradientes para la separación y cuantificación de péptidos mediante UHPLC

Tiempo (min)	Concentración de A	Concentración de B
0	96%	4%
60	55%	45%
61	10%	90%
81	96%	4%

Se utilizó un equipo Thermo Orbitrap Fusion (Q-OT-qIT, Thermo Scientific, Massachusetts, EE.UU.) para eluir los péptidos mediante ionización por nanoelectrospray generando la transformación de los cationes en iones con el espectrómetro operando en modo positivo. Se llevó a cabo una exploración de barrido de los precursores de péptidos (400-500 m/z) a una resolución de 120 K (200

m/z) con un detector de iones de 5×10^5 . La MS en tándem se realizó por aislamiento con cuadrupolo a 1 Th, la consecuente fragmentación CID con una energía de colisión normalizada de 35, y por último un análisis de barrido rápido de MS en trampa de iones. El detector de iones se ajustó a 10^2 y a un tiempo máximo de 75 ms. Únicamente aquellos precursores cuyo estado de carga comprendía entre 2 y 6 fueron muestreados para MS2, el tiempo de exclusión dinámica fue de 15 segundos con una tolerancia de 10 ppm entre los precursores seleccionados y sus isótopos. Para la selección de precursores monoisotópicos, se llevaron a cabo tres ciclos de MS2 a velocidad máxima de forma continuada.

La identificación y cuantificación de los péptidos se llevó a cabo utilizando los espectros de los péptidos (PSM) mediante el software Proteome Discoverer v.2.1.0.81, Thermo Scientific, Massachusetts, EE.UU.) y los espectros MS2 se analizaron con SEQUEST HT en la base de datos UniProtKB (www.uniprot.org).

Para poder comparar entre muestras, los valores de cuantificación se normalizaron utilizando el total de PSMs para todos los péptidos de la muestra empleando el programa R versión 3.4.1 (www.r-project.org). Por otro lado, los péptidos identificados fueron volcados en la base de datos BIOPEP con la finalidad de establecer aquellos péptidos con bioactividad en la muestra y aquellos con potencial bioactividad ya que contenían secuencias con bioactividad en su estructura primaria.

4.4. ELABORACIÓN DE LOS QUESOS TIPO

Se elaboraron 2 lotes con dos partidas de leche de diferentes días de recolección (Figura IV.6). Por cada lote se produjeron un total de 6 quesos de cada uno de los tipos de coagulante (Tabla IV.3).

4.4.1. Elaboración de los quesos tipo “Murcia al vino”

Los quesos Murcia al vino se elaboraron en una quesería industrial (Quesería Tío Rest, <http://tiorest.es>) situada en Caravaca de la Cruz (Murcia, España) siguiendo estrictamente el procedimiento descrito por el Consejo Regulador de la DOP Queso de Murcia al vino (Figura IV.7).

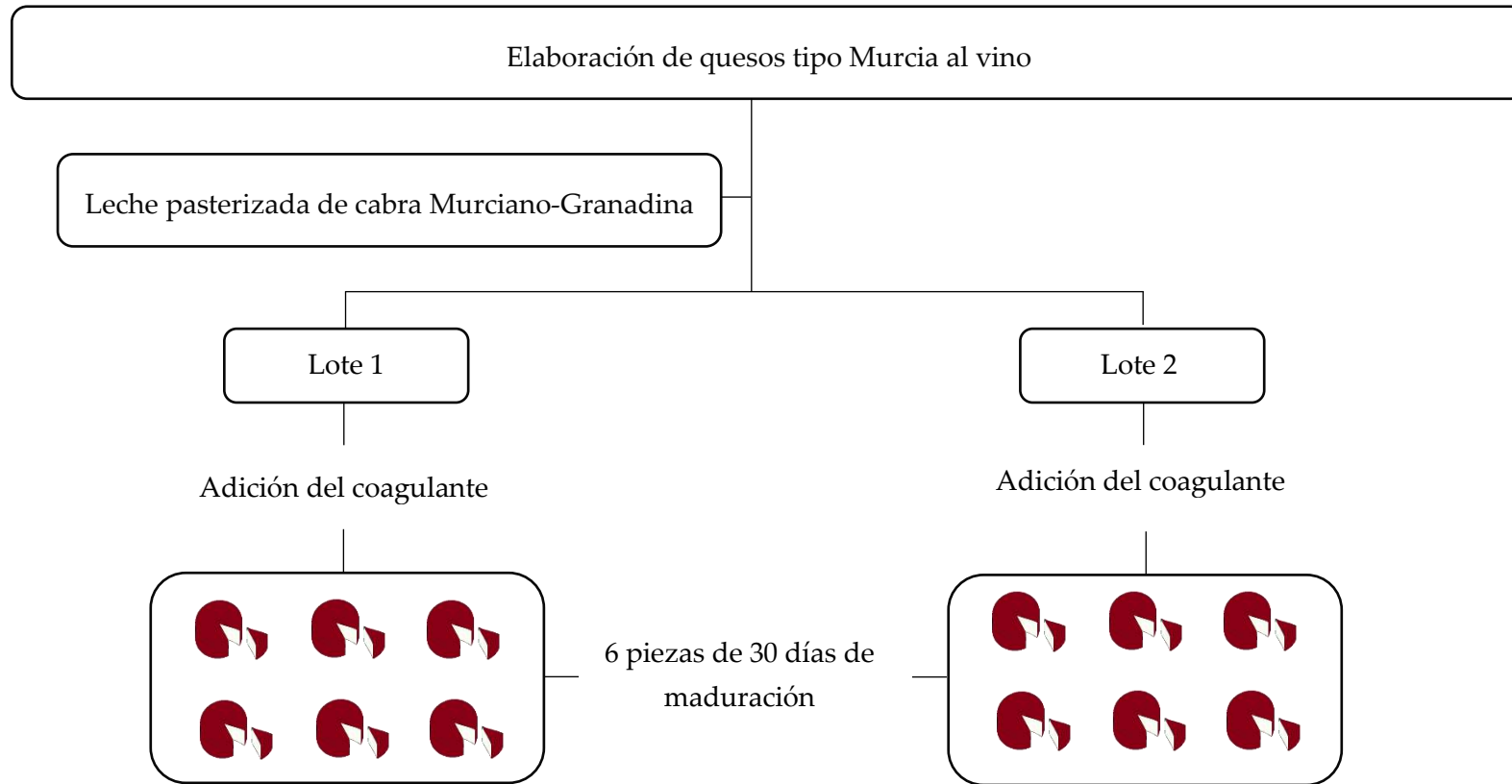


Figura IV.6 Diseño experimental de la elaboración de quesos tipo Murcia al vino

Los tipos de coagulante empleado en cada lote de queso se resumen en la tabla IV.4

Tabla IV.3 Lotes de queso tipo Murcia al vino producidos con diferentes coagulantes.

Tipo de coagulante	Número de lotes	Número de piezas por lote
AR	2	6
COM	2	6
AR/OP	2	6
CH	2	6
CC	2	6
OP	2	6

AR: Cuajo animal líquido comercial; COM: *Cynara cardunculus* L. líquido comercial; AR/OP: Cuajo animal líquido comercial y *Onopordum platylepis* Murb. de crecimiento espontáneo; CH: *Cynara humilis* L. de crecimiento espontáneo; CC: *Cynara cardunculus* L. de crecimiento espontáneo; OP: *Onopordum platylepis* Murb. de crecimiento espontáneo.

Un total de 12 lotes de queso tipo “Murcia al vino”, de 6 quesos cada lote, se elaboraron utilizando diferentes partidas de leche pasteurizada de cabra de la raza Murciano-Granadina. En las Figuras IV.8, IV.9, IV.10, y IV.11 se muestran los principales pasos de su elaboración.

A la leche previamente precalentada a 34°C se le añadieron 10 UC de cultivos iniciadores de fermento láctico liofilizado MO-PROQ 10 (Proquiga Biotech, La Coruña, España) y 10 mL de una solución comercial de cloruro cálcico a una concentración de entre 512-532 g/L. Seguidamente se añadió el coagulante y se agitó suavemente para homogeneizar.

Los extractos crudos liofilizados de cardo se reconstituyeron en agua mineral sin cloruros y se añadieron a las cantidades y concentraciones especificadas en la tabla IV.4. El coagulante vegetal líquido comercial (COM) procedente de flores de *Cynara cardunculus* L. y cuajo animal líquido comercial (AR) se añadió según las especificaciones del comerciante.

Tras la coagulación (entre 30-60 minutos), la cuajada se rompió manualmente con una lira para quesos en granos de tamaño medio y se mantienen intervalos de

agitación y reposo durante 20 minutos. Se realizó el lavado de la pasta hasta la eliminación del 15% de suero y se reemplazó su volumen con agua potable a 38°C. La cuajada se transfirió a moldes perforados de plástico y se prensó automáticamente a 1 atm. durante 1 hora para eliminar el suero. Los quesos se salaron en salmuera (18%(p/v)) durante una hora, se sumergieron en baño de vino tinto durante 30 minutos y se trasladaron a la cámara de maduración.

Durante el período de maduración de 30 días, las piezas de queso se mantienen en condiciones controladas (9-13°C y 70-90% de humedad relativa) y se efectuaron prácticas de volteo, limpieza y baño con vino tinto.

Tabla IV.4 Concentraciones y cantidades añadidas de los diferentes coagulantes empleados en la fabricación de los quesos tipo Murcia al vino.

Tipo de coagulante	Cantidad añadida por L de leche
AR ¹	4,0 mL
COM ¹	0,35 mL
OP ²	1,7 g
AR/OP ¹	51,5 mL
CC ¹	100 mL
CH ²	0,28 g

¹Valores expresados en mL por L de leche

²Valores expresados en g de extracto liofilizado por L de leche

A continuación, un diagrama de flujo que representa el proceso de fabricación de los quesos tipo Murcia al vino.

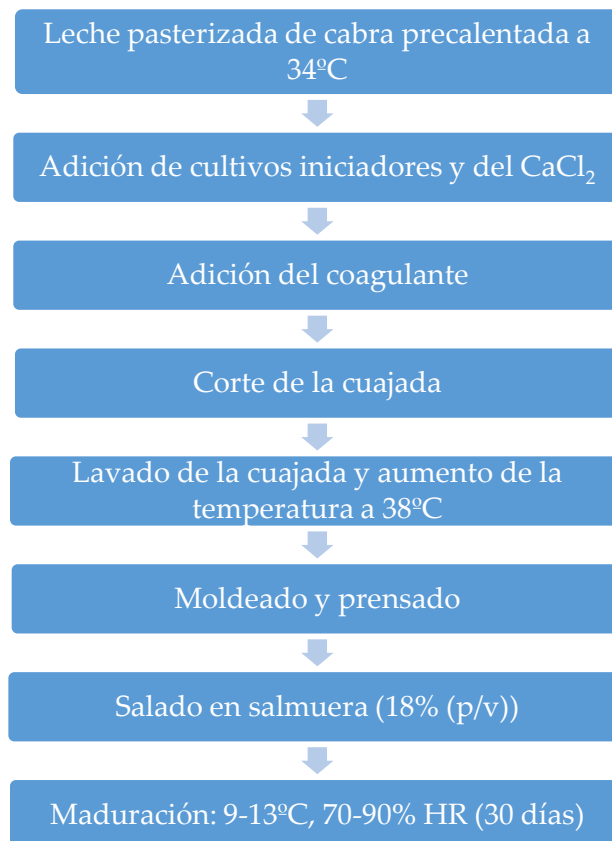


Figura IV.7 Proceso de elaboración de los quesos tipo Murcia al vino.



Figura IV.8 Calentamiento y homogeneización de la leche. Adición de los cultivos iniciadores, del cloruro cálcico y del coagulante.



Figura IV.9 Corte y lavado de la cuajada.



Figura IV.10 Moldeo y pieza de queso después del prensado.



Figura IV.11 Piezas de queso antes y después del baño con vino tinto.

4.5. DETERMINACIONES MICROBIOLÓGICAS

4.5.1. Preparación de las muestras

Para los recuentos microbianos viables en las muestras de queso, se homogeneizaron 10 g de cada muestra con 90 mL de agua de peptona estéril (peptona bacteriológica, 1 g L⁻¹, Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) con un Stomacher 400 Circulator (International PBI, Milán, Italia) durante 2 minutos a 260 rpm; se inocularon por duplicado alícuotas de diluciones seriadas de los homogeneizados en los medios de crecimiento oportunos para el recuento de los distintos grupos microbianos.

4.5.2. Recuentos

La siembra de las bacterias aerobias mesófilas se realizó en placas Petri estériles utilizando el medio de cultivo Plate Count Agar (PCA) y se incubaron a 30 °C durante 48 h; para determinar la presencia de Pseudomonadaceae se realizó en el medio Pseudomonas Agar Base (PAB) suplementado con Ceftriaxona, Ácido Fusídico y Cefaloridina (CFC), y se incubó a 30°C durante 48 h; la presencia de Enterobacteriaceae se evidenció con agar Bilis Glucosa con cristal violeta y rojo neutro (VRBGA) y las placas se incubaron a 37°C durante 24 h; el recuento de bacterias coliformes y *Escherichia coli* se realizó en agar cromogénico coliformes (CCA) incubando a 37°C durante 24 h; para el recuento de levaduras y mohos, se utilizó el agar Rosa de Bengala (RB) y se incubó a 25°C durante 72 h.

En cuanto a los cultivos protecnológicos de interés en la industria alimentaria láctea, se llevó a cabo el recuento de presuntos lactobacilos en agar de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) incubado a 30°C durante 48 h; y para el recuento de presuntos lactococos mesófilos y termófilos se utilizó el agar M17 incubado a 22 y 45°C, respectivamente, durante 48 h.

Los resultados se expresaron como el logaritmo de unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo de cada muestra.

Cada muestra de queso también se analizó para *Listeria monocytogenes* según la norma UNE-EN ISO 11290-1:2018 (UNE, 2018b), *Salmonella* spp. siguiendo lo descrito en la norma UNE-EN ISO 6579-1:2017/A1:2021 (UNE, 2021) y enterotoxinas estafilocócicas (A, B, C, D, E) según la norma UNE-EN ISO 19020:2017 (UNE, 2018a) mediante ensayo de fluorescencia ligado a enzima (ELFA).

4.6. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS QUESOS

4.6.1. pH

Las medidas de pH se realizaron a temperatura ambiente por punción directa del queso con un electrodo de vidrio con una cuchilla de penetración para muestras duras utilizando un pH-metro pH 7 Vio (XS Instruments, Carpi, Italia). El pH-metro se calibró previamente a las mediciones con soluciones estándar de pH 7,00 y pH 4,00. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

4.6.2. A_w

La actividad del agua se midió con un instrumento medidor de actividad Rotronic HygroPalm HP23-AW-A (Bassersdorf, Zürich, Suiza). Para ello se colocaron 3 gramos de muestra de queso previamente triturada en la celda del equipo y se realiza la lectura tras aproximadamente 1 hora de tiempo de estabilización de la medida.

4.6.3. Humedad

El contenido de humedad se determinó indirectamente por desecación en una estufa de aire caliente a 105°C hasta peso seco constante siguiendo el método descrito por la IDF (1958). Se utilizaron cápsulas de aluminio previamente desecadas en la estufa a 105°C y enfriados en un desecador hasta alcanzar temperatura ambiente. Tras el enfriamiento fueron pesadas y 10 gramos de muestra fueron añadidos a las cápsulas. Se introdujeron en una estufa a una temperatura fijada en 105°C y permanecieron hasta alcanzar un peso constante, aproximadamente 24 horas. Se procedió a enfriar las muestras en un desecador

para posteriormente pesarlas. Se determinó el contenido en humedad mediante diferencia de pesadas.

4.6.4. Extracto seco

El contenido en extracto seco de las muestras de queso se obtuvo restando el valor de la determinación de humedad a 100.

4.6.5. Cenizas

Para determinar las cenizas de las muestras de queso se utilizó el método 935.42 de la A.O.A.C (2002). Se utilizaron crisoles de porcelana previamente desecados en la estufa a 105°C, enfriados en un desecador hasta alcanzar temperatura ambiente, y pesados. La muestra de queso previamente desecada durante 24 horas en estufa a 105°C, se introduce en los crisoles y se incinera en un horno de mufla a 530°C durante 24 horas (Figura IV.12). Transcurrido este tiempo, las muestras son enfriadas hasta temperatura ambiente en un desecador y son pesadas. La medición se realiza por diferencia de pesadas.



Figura IV.12 Determinación del contenido en cenizas de las muestras de queso.

4.6.6. Grasa

La determinación de la grasa se realizó por triplicado mediante un sistema de extracción con disolvente en un equipo ST 255 Soxtec™ (FOSS, Dinamarca) según la norma ISO 14156:2001.

Los vasos de extracción de aluminio son desecados en estufa a 105°C, enfriados en desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente y pesados. La muestra de queso previamente triturada y desecada (1 gramo) se añade a unos cartuchos de extracción de celulosa que son introducidos en el sistema. Seguidamente se colocaron los vasos de extracción de aluminio con 70 mL de dietiléter en los cuales se sumergen los cartuchos de celulosa precargados con la muestra. El proceso de extracción se realiza a una temperatura de 95°C. El cálculo de la grasa se realiza mediante diferencia de pesada (Figura IV.13).



Figura IV.13 Determinación del contenido en grasa de las muestras de queso.

4.6.7. Proteína

El contenido en proteína se determinó por el método Kjeldahl según la norma ISO 8968-1:2014 utilizando un equipo de digestión (Büchi SpeedDigester Unit K-436). Partiendo de las muestras picadas de queso, se pesó 1 gramo de muestra y se introdujeron en los tubos Kjeldahl. Seguidamente se añadió una tableta catalizadora Kjeldahl de 5 gramos (Scharlab S.L., Barcelona, España) que están compuestas por 1,5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 2% Se. A la mezcla se añadieron 10 mL de H_2SO_4 e inmediatamente se colocaron los tubos en el digestor a 420°C.

Tras el proceso de digestión se llevaron los tubos a un equipo de destilación de proteínas (Büchi MultiKjel K-365) y fueron destilados uno a uno con 70 mL de NaOH al 40% y 10 mL de agua destilada. El contenido de la destilación se iba vertiendo en un matraz Erlenmeyer que contenía 25 mL de ácido bórico al 4% y unas gotas de indicador rojo de metilo.

Finalizada la destilación, se llevó a cabo una titulación con HCl 0,1 N, obteniendo el valor de nitrógeno total (NT), el cual se multiplica por el factor de conversión para productos lácteos 6,38 para obtener el valor de proteína bruta.

4.6.8. Cloruro sódico

El contenido de sal (NaCl) se midió con un equipo LAQUAtwin Salt-22 (Horiba Advanced Techno Co., Kioto, Japón) en extractos acuosos 1:10 (p/v) de queso. La calibración del equipo se llevó a cabo utilizando soluciones estándar de NaCl al 0,5% y 5,0%.

4.7. EVALUACIÓN DE LA PROTEÓLISIS DE LOS QUESOS

4.7.1. Determinación de las fracciones nitrogenadas

Se determinaron las fracciones nitrogenadas según lo descrito por Kuchroo y Fox (1982) y siguiendo el procedimiento de Tejada y col. (2008c).

4.7.1.1. *Nitrógeno soluble*

Para la determinación del nitrógeno soluble (NS) se prepara una mezcla de 15 gramos de muestra de queso previamente triturado y 50 mL de agua destilada. La mezcla se mantiene en un baño maría a 40°C durante 1 hora, pasado este tiempo se homogeneizó y se llevó a un volumen de 100 mL con agua destilada. Se tomó una alícuota de 50 mL y se bajó el pH a 4,6 con HCl 0,1 N. Tras 30 minutos de reposo, se añadió agua destilada hasta alcanzar un volumen final de 100 mL y la solución resultante fue centrifugada a 3000 rpm durante 5 minutos y filtrada con papel Whatman N° 1. Alícuotas de 5mL del filtrado resultante son analizadas mediante el método Kjeldahl siguiendo la misma técnica detallada en el apartado 4.6.7 de esta memoria de Tesis Doctoral.

4.7.1.2. *Nitrógeno no proteico*

Esta fracción de nitrógeno no proteico (NNP) se obtiene tomando una alícuota de 16 mL de la suspensión de queso homogeneizada y preparada mediante lo descrito en el apartado 4.7.2.1 y se precipitaron las proteínas añadiendo 4 mL de

Ácido tricloroacético al 60% (p/v). Tras 30 minutos de reposo, la solución se centrifuga a 3000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se filtra con papel Whatman N° 1. Alícuotas de 5 mL del filtrado resultante son analizadas mediante el método Kjeldahl descrito en el apartado 4.6.7 de esta memoria de Tesis Doctoral.

4.7.2. Determinación de los aminoácidos libres

El contenido de aminoácidos libres se obtuvo según Abellán y col. (2012a). Las muestras de queso fueron trituradas (10 gramos), disueltas en agua destilada en un ratio 1:3 (p/v) y se homogeneizaron utilizando un homogeneizador Ultraturax® IKA-Werke (GmbH & Co., Staufen, Alemania) durante 2 minutos. El homogeneizado se mantuvo a 40°C durante 1 hora, el pH se ajustó a 4,6 con HCl 0,1 mol L⁻¹ y la suspensión se centrifugó durante 30 minutos a 5°C y 4800x g. Tras la centrifugación, se obtuvieron tres capas; la capa superior de grasa se eliminó. El sobrenadante se filtró a través de papel Whatman N° 42 y se diluyó a 100 mL, constituyendo la fracción hidrosoluble. Se añadieron 2 mL de ácido sulfosalicílico (SSA) al 15% p/v a 10 mL de la fracción hidrosoluble para alcanzar una concentración final del 2,5% (p/v) SSA (Reiter y col., 1969). La suspensión se centrifugó durante 30 minutos a 20°C y 4800x g. La solución sobrenadante se ajustó a pH 4,0 y se almacenó en un congelador a -22°C para el análisis cromatográfico. La derivatización previa a la columna se llevó a cabo mezclando 200 µL de estándar o muestras, 200 µL de dodecil sulfato de sodio al 2% en borato de sodio 0,4 mol L⁻¹ (pH 9,5) y 200 µL de solución derivatizante preparada según lo descrito por Jones y col. (1981). La reacción se detuvo después de 1 minuto con 400 µL de fosfato de potasio 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,6). La solución se mezcló y se filtró a través de un filtro desechable de 0,2 µm antes de inyectar 10 µL. Las muestras se diluyeron antes de la derivatización para ajustarlas al intervalo de las curvas de calibración.

Se utilizó un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) Beckman System Gold (Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA, EE.UU.) (módulo de disolvente programable 125S, y un bucle simple de 20 µl modelo 7725i) con detector de fluorescencia modelo FP-1520 (Jasco Corp., Tokio, Japón). La separación se llevó a cabo en una precolumna de fase inversa Ultrasphere ODS (Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA, EE.UU.) de 45 mm × 4,6 mm de diámetro interno, seguida de una columna de fase inversa Ultrasphere ODS C18

(Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA, EE.UU.) de 250 mm × 4,6 mm de diámetro interno a 30°C.

Se utilizaron los siguientes ajustes del fluorímetro: Celda de flujo de 9 μL , filtro de excitación en el intervalo de 305-375 nm, filtro de emisión en el intervalo de 430-470 nm, tiempo constante de 0,5 segundos y una sensibilidad de 0,02 unidades. Se llevó a cabo una elución en gradiente para la separación del derivado orto-ftalaldehído (OPA) utilizando el disolvente A - tetrahidrofurano: metanol:0,05 mol L^{-1} acetato de sodio, pH 5,9 (1:19:80) - y el disolvente B - metanol:0,05 mol L^{-1} acetato de sodio, pH 5,9 (80:20). El programa de gradiente fue: composición inicial 0% B, paso isocrático a 0% B durante 1 minuto, paso lineal a 14% B en 5 minutos, paso isocrático a 14% B durante 5 minutos, paso lineal a 50% B en 5 minutos, paso isocrático a 50% B durante 4 minutos, paso lineal a 100% B en 12 minutos, paso isocrático a 100% B durante 8 minutos. El flujo fue de 1,2 mL min^{-1} . Los disolventes utilizados eran de grado HPLC y se filtraron al vacío a través de un filtro de 0,45 μL (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.). Los aminoácidos se identificaron según sus tiempos de retención por comparación con el cromatograma de una solución estándar. La solución estándar se preparó en diferentes concentraciones (entre 0,2 y 37 mg L^{-1}), de los siguientes aminoácidos: Thr (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.) Asp, Asn, Glu, His, Ser, Gln, Arg, Gly, Ala, Tyr, Cys, Pro, Trp, Met, Phe, Val, Leu, Ile y Lys (Acro Organics, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Se utilizó un paquete de software para el control del sistema y la adquisición de datos (32 Karat v. 5.0, Beckman).

4.7.3. Determinación de los péptidos hidrófobos e hidrófilos

La concentración de péptidos hidrofílicos e hidrofóbicos de los quesos se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) utilizando un equipo 1200 series HPLC system (CA, EE. UU.), según el método descrito por Tejada y col. (2008c).

Se separaron los péptidos de la fracción de nitrógeno soluble, obtenida mediante lo descrito previamente en el apartado 4.7.2.1 de la memoria de esta Tesis Doctoral, utilizando una columna ZORBAX Eclipse XDB-C-18 (4,6 × 250 mm, 5 μm) a una temperatura constante de 40°C. Se inyectaron 50 μL de muestra previamente filtrada con filtros de acetato de celulosa CHROMAFIL® Xtra CA-45/25

(MACHERY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Alemania) y la detección se llevó a cabo con un detector Diode array (DAD) modelo G1315D (Agilent technologies, CA, EE. UU.) a una longitud de onda (λ) de 214 nm.

Para la separación cromatográfica se utilizaron dos solventes, el solvente A) 0,05% de ácido trifluoroacético (TFA) en agua, y el solvente B) 0,035% de TFA en acetónitrolo:agua (90:10 (v/v)) con un flujo de 1,0 mL/min. La configuración de los gradientes utilizados para la separación de los péptidos se muestra en la tabla IV.5

Tabla IV.5 Programa de gradientes para el análisis de péptidos hidrófobos e hidrófilos mediante RP-HPLC

Tiempo (min)	Concentración de A	Concentración de B
0	100%	0%
20	97%	3%
58	50%	50%
85	100%	0%

La diferente naturaleza de los péptidos se estimó en función del tiempo de retención, considerando péptidos hidrófobos los que aparecían después del pico correspondiente al aminoácido triptófano (L-Trp \geq 98%, Sigma-Aldrich, Madrid, España), e hidrófilos los que aparecían en la porción de péptidos retenidos entre el aminoácido tirosina (L-Tyr, +99%, Acros Organics, Fairlawn, NJ, USA) y el aminoácido triptófano. Para ello se preparó una solución patrón que contenía tirosina (Tyr) y triptófano (Trp) a una concentración de 0,1 g/L cada uno. El tiempo de retención de Tyr fue de 4,7 minutos y el de Trp fue de 19,4, por esta razón se consideró que la fracción de péptidos hidrófilos es la suma de las áreas integradas de los picos obtenidos entre los 4,7 y los 19,4 minutos, mientras que la fracción de péptidos hidrófobos se consideró como la suma de las áreas integradas de los picos obtenidos a partir de los 19,4 minutos hasta el fin del análisis.

Para determinar la relación de péptidos hidrófobos/hidrófilos se dividió el área total de los picos de la fracción de péptidos hidrófobos entre el área total de los picos de la fracción de péptidos hidrófilos (Abellán y col., 2012b)

Estas determinaciones se realizaron por triplicado para cada tipo de queso.

4.8. EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS SENSORIALES

4.8.1. Análisis instrumental de textura

El análisis del perfil de textura (TPA) se llevó a cabo utilizando un analizador de textura CT3-50K (Brookfield CNS Farnell, Borehamwood, Reino Unido).

Para las muestras de queso de Murcia al vino se siguió el procedimiento según lo descrito por García y col. (2014). Se cortaron las muestras en forma de cubo (3 cm^3) de un queso sin corteza en condiciones de refrigeración ($4\text{-}6^\circ\text{C}$) y equilibrado durante 30 minutos a temperatura ambiente ($20 \pm 0,5^\circ\text{C}$) antes del análisis (Figura IV.14). Las condiciones del análisis TPA fueron las siguientes: 20°C de temperatura ambiente; sonda cilíndrica plana de 36 mm de diámetro; velocidad de la probeta de 0,2 mm/s y 10 mm de distancia.

Se midieron las variables de dureza (expresada en g), cohesividad (adimensional), elasticidad (expresada en mm) y adhesividad (expresada en mJ).



Figura IV.14 Análisis del perfil de textura de las muestras de queso.

4.8.2. Análisis instrumental del color

Para medir el color en las muestras de queso tipo Murcia al vino se cortaron en tres rodajas de 1 cm de grosor y se realizaron las mediciones de los parámetros de color definidos en el sistema CIE-LAB, donde la coordenada L^* representa la luminosidad (abarca valores de 0% a 100%, de oscuro a claro), la coordenada a^* corresponde al índice de rojos-verdes (abarca valores de -60 a 60, de verde a rojo) y la coordenada b^* corresponde al índice de amarillos-azules (abarca valores de -60 a 60, de azul a amarillo). También se midieron los parámetros de saturación, Chroma (C^*), y el tono (H^*).

Se utilizó un espectrofotómetro ColorFlex (HunterLab, Virginia, EE.UU.) el cual fue previamente calibrado.

4.8.3. Análisis sensorial

El análisis sensorial de las muestras de queso tipo Murcia al vino se llevó a cabo mediante un estudio cuantitativo-descriptivo con un panel de cata entrenado y un test de aceptabilidad con un panel de cata no entrenado.

Siguiendo las pautas indicadas en la norma UNE 87004 (AENOR, 1979), las salas en las que se desarrollaron todas las sesiones de cata descriptiva de ambos tipos de queso eran neutras, con ventilación apropiada para evitar olores extraños, provistas de buena iluminación y temperatura y humedad constantes (Figura IV.21). Los puestos de cata estaban provistos del cuestionario de cata, un bolígrafo, una servilleta, guantes desechables, una botella de agua a temperatura ambiente, y trozos de manzana o picos de pan para neutralizar las condiciones internas de la boca antes de la evaluación de cada muestra (Figuras IV.15 y IV.22). La preparación de las muestras en todos los análisis se llevó a cabo en una sala independiente distanciada de la zona de evaluación.



Figura IV.15 Cabina para análisis sensorial descriptivo.

4.8.3.1. Test descriptivo

El estudio de las características organolépticas de las muestras de queso tipo Murcia al vino se llevó a cabo mediante varias sesiones de cata realizadas en las instalaciones del panel de cata de la D.O.P Murcia al vino por un grupo de 20 panelistas entrenados, y fueron supervisadas por un Técnico del Consejo Regulador.

El análisis inicia con una fase visual en la que los catadores entrenados evaluaron 11 atributos relacionados con la apariencia de la corteza y la pasta y la textura en mano; para ello los catadores visualizan y palpan una pieza de queso entera y la mitad de otra (Figura IV.16).

En la siguiente fase, olfativo-gustativa, se evalúan los 17 parámetros restantes relacionados con las características organolépticas de olor, textura en boca, sabor, y gusto residual. Las muestras en esta fase se presentaron en placas de Petri esterilizadas en forma de cuña de ± 8 mm de espesor y atemperadas a $\pm 15^{\circ}\text{C}$ (Figura IV.17).

En la ficha de cata, en ambas fases, la percepción de los catadores sobre cada uno de los descriptores fue señalada en una escala con un rango de 0 a 10. Los atributos evaluados en la fase visual se presentaron en una escala con intervalos, mientras que los atributos de la segunda fase se presentaron mediante escalas no

estructuradas con puntos extremos. Los atributos pueden tener un carácter principal o secundario en función de su importancia en la percepción global y presentan un nivel de tolerancia con valores mínimos y máximos.



Figura IV.16 Preparación de las muestras de queso tipo Murcia al vino para la fase visual del test sensorial descriptivo.



Figura IV.17 Preparación de las muestras de queso tipo Murcia al vino para la fase olfativo-gustativa del test sensorial descriptivo.

4.8.3.2. Test de aceptación

Para determinar la aceptabilidad general del queso de Murcia al vino elaborado con distintos coagulantes, las muestras de queso tipo Murcia al vino fueron evaluadas en un panel de 100 consumidores con una media de edad de 43 años y la distribución por sexos casi equilibrada. Las características

sociodemográficas de la población que participó en el análisis sensorial se recogen en la tabla IV.6

Tabla IV.6 Características de los participantes del estudio sensorial de consumidores.

	Niveles	Porcentaje
Edad	20-39 años	40%
	40-59 años	38%
	60-80 años	22%
Sexo	Mujer	41%
	Hombre	59%
Situación laboral	Activo	68%
	Inactivo	32%
Consumo de queso	Regular	95%
	Ocasional	5%
Consumo de queso Murcia al vino	Regular	12%
	Ocasional	63%
	Nunca	25%

Regular: 1 o más veces a la semana, Ocasional: menos de 1 vez a la semana.

El estudio constó de tres fases detalladas en la tabla IV.7, en los cuales se evaluaron dos tipos de queso, Queso de Murcia al vino de elaboración tradicional con cuajo animal (MVAR) y Queso de Murcia al vino elaborado con coagulante vegetal comercial (MVVR). Las primeras dos fases se llevaron a cabo el mismo día, y la última fase se realizó tres días después.

La primera fase, se les presentó a los consumidores MVAR y MVVR en un orden aleatorio de presentación y se les pidió que probaran el queso y valoraran el grado de aceptación sin tener información sobre los productos (aceptación percibida), es decir, una cata a ciegas. Para la segunda fase, los sujetos recibieron dos hojas con información referente a los tipos de coagulantes enzimáticos empleados en la elaboración de queso (cuajo animal o coagulantes vegetales), las

cuales tuvieron que leer y seguidamente calificar su expectativa de aceptación (aceptación esperada). En la tercera fase, se les pidió que leyeran nuevamente la información referente a los tipos de coagulantes enzimáticos antes de probar la muestra de queso elaborado con coagulante vegetal comercial y que expresaran el grado de aceptación de dicha muestra (aceptación real).

Tabla IV.7 Diseño experimental para la evaluación de la aceptación del queso y la disposición a pagar del consumidor.

Fase	Día	Presentación de estímulo	Tipo de evaluación	Tipo de calificación
1	1	MVAR y MVVR	Cata sin información	Aceptación percibida
2	1	Información	Expectación	Aceptación esperada
3	2	MVVR e información	Cata con información	Aceptación real

Las hojas de cata (Figuras IV.18, IV.19, y IV.20) constaban de una escala hedonista de 9 categorías sobre el nivel de aceptación de la muestra: me encanta, me gusta mucho, me gusta un poco, me gusta ligeramente, ni me gusta ni me disgusta, me disgusta ligeramente, me disgusta un poco, me disgusta mucho, no me gusta nada. Las hojas de información contenían la siguiente información:

- Cuajo animal: El cuajo es un conjunto de enzimas que se utilizan para separar la leche en cuajada sólida (para la fabricación de queso) y suero líquido que suele desecharse. La fuente más común para el cuajo es el estómago de los animales rumiantes, como la vaca, la oveja o la cabra.
- Coagulante vegetal: El coagulante es un conjunto de enzimas que se utilizan para separar la leche en cuajada sólida (para la fabricación de queso) y suero líquido que suele desecharse. El coagulante vegetal puede prepararse a partir de flores y/u hojas jóvenes de plantas perennes espinosas (comúnmente conocidas como "cardos") tanto silvestres como cultivadas.

Test de aceptabilidad (Fase 1)

Fecha: _____

1. Enjuague su boca con agua antes de comenzar
2. Tras probar la primera muestra, indique el grado de satisfacción
3. Entre muestra y muestra es conveniente que vuelva a enjuagar su boca

Código de muestra: _____

- Me encanta
- Me gusta mucho
- Me gusta un poco
- Me gusta ligeramente
- Ni me gusta ni me disgusta
- Me disgusta ligeramente
- Me disgusta un poco
- Me disgusta mucho
- No me gusta nada

Figura IV.18 Formulario correspondiente a la Fase 1 del estudio del grado de aceptación percibida de consumidores del queso de Murcia al vino elaborado con cuajo animal y coagulante vegetal.

Test de aceptabilidad (Fase 2a)

Fecha: _____

Por favor lea la información del producto

Si le presentaran este queso ahora mismo, ¿cuánto cree que le gustaría? (Marque la casilla correspondiente a su valoración)

Muestra: Queso de Murcia al vino con cuajo animal

- Me encanta
- Me gusta mucho
- Me gusta un poco
- Me gusta ligeramente
- Ni me gusta ni me disgusta
- Me disgusta ligeramente
- Me disgusta un poco
- Me disgusta mucho
- No me gusta nada

Test de aceptabilidad (Fase 2b)

Fecha: _____

Por favor lea la información del producto.
Si le presentaran este queso ahora mismo, ¿cuánto cree que le
gustaría? (Marque la casilla correspondiente a su valoración)

Muestra: Queso de Murcia al vino con coagulante vegetal

- Me encanta
- Me gusta mucho
- Me gusta un poco
- Me gusta ligeramente
- Ni me gusta ni me disgusta
- Me disgusta ligeramente
- Me disgusta un poco
- Me disgusta mucho
- No me gusta nada

Figura IV.19 Fichas de cata correspondientes a la Fase 2 del estudio del grado de aceptación esperada de consumidores del queso Murcia al vino elaborado con cuajo animal y coagulante vegetal.

Test de aceptabilidad (Fase 3)

Fecha: _____

Por favor, huela y pruebe el **queso con coagulante vegetal** que se le presenta y exprese su nivel de agrado marcando la casilla correspondiente a su valoración. Enjuague su boca entre una muestra y otra.

Muestra: Queso de Murcia al vino con coagulante vegetal

- Me encanta
- Me gusta mucho
- Me gusta un poco
- Me gusta ligeramente
- Ni me gusta ni me disgusta
- Me disgusta ligeramente
- Me disgusta un poco
- Me disgusta mucho
- No me gusta nada

Figura IV.20 Ficha de cata correspondiente a la Fase 3 del estudio del grado de aceptación real de consumidores del queso Murcia al vino elaborado con coagulante vegetal.



Figura IV.221 Sala de catas acondicionada para test de consumidores.



Figura IV.22 Puesto de cata para el análisis sensorial de consumidores.

4.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Para determinar las diferencias significativas y los grupos homogéneos de medidas se analizaron los datos mediante un análisis de varianza (ANOVA). El método TUKEY se utilizó para comparar las medias cuando las interacciones eran significativas ($p < 0,05$). El análisis de datos multivariantes se llevó a cabo mediante el análisis de componentes principales.

Para la optimización de parámetros de la actividad coagulante y proteolítica de los extractos crudos liofilizados de cardo se utilizó el software JMP v. 17.0 (SAS Institute Inc., Nueva York, EE.UU) y se empleó la metodología de superficie de respuesta (RSM) y la metodología de regresión por mínimos cuadrados para la estimación de parámetros mediante una ecuación polinómica de segundo orden.

Una descripción más detallada del análisis estadístico de cada estudio se realiza en cada uno de los artículos que se incluyen en el capítulo V de esta memoria de tesis doctoral.

V – RESULTADOS

V - RESULTADOS

5.1. CAPÍTULO I. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD COAGULANTE, PROTEOLÍTICA, Y DE LAS PROPIEDADES TECNOLÓGICAS DE LOS COAGULANTES VEGETALES. BIOACTIVIDAD DE LOS HIDROLIZADOS DE CASEÍNA OBTENIDOS.

Este capítulo aborda la caracterización tecnológica de los extractos de cardo de las especies *Cynara cardunculus*, *Cynara humilis*, *Onopordum tauricum* y *Onopordum platylepis* para su utilización como coagulante de la leche en la elaboración de quesos y responde al primer objetivo específico. Este capítulo se compone de los siguientes artículos:

ARTÍCULO 1: Foligni, R., Mannozi, C., Gasparrini, M., Raffaelli, N., Zamporlini, F., Tejada, L., Bande-De León, C., Orsini, R., Manzi, P., Di Constanzo, M.G., Ritota, M., Aquilanti, L. & Mozzon, M. (2022). **Potentialities of aqueous extract from cultivated *Onopordum tauricum* (Willd.) as milk clotting agent for cheesemaking.** *Food Research International*, 158, 111592.

ARTÍCULO 2: Bande-De León, C., Buendía-Moreno, L., Abellán, A., Manzi, P., AlMohandes Dridi, B., Essaidi, I., Aquilanti, L. & Tejada, L. (2023). **Clotting and proteolytic activity of freeze-dried crude extracts obtained from wild thistles *Cynara humilis* L. and *Onopordum platylepis* Murb.** *Foods*, 12, 2325.

ARTÍCULO 3: Bande-De León, C., Delgado, D., Fernández, D., Mozzon, M., Abellán, A., Aquilanti, L. & Tejada, L. (2023). **Optimization of milk-clotting activity and rheological properties characterization of *Onopordum platylepis* Murb. in ewe's milk.** *Journal of Dairy Science* (Enviado).

ARTÍCULO 4: Bande-De León, C., Delgado, D., Fernández, D., Mozzon, M., Abellán, A., Aquilanti, L. & Tejada, L. **Validation of freeze-dried plant extract obtained from *Onopordum platylepis* Murb. as goat's milk coagulant.** (En preparación).

5.1.1. Potencialities of aqueous extract from cultivated *Onopordum tauricum* (Willd.) as milk clotting agent for cheesemaking



Potentialities of aqueous extract from cultivated *Onopordum tauricum* (Willd.) as milk clotting agent for cheesemaking

Roberta Foligni^{a,1}, Cinzia Mannozi^{a,1}, Massimiliano Gasparrini^{a,*}, Nadia Raffaelli^a, Federica Zamporlini^a, Luis Tejada^b, Cindy Bande-De León^b, Roberto Orsini^a, Pamela Manzi^c, Maria Gabriella Di Costanzo^c, Mena Ritota^c, Lucia Aquilanti^a, Massimo Mozzon^{a,*}

^a Department of Agricultural, Food and Environmental Sciences, Università Politecnica delle Marche, Via Brecce Bianche 10, 60121 Ancona, Italy

^b Department of Human Nutrition and Food Technology, Universidad Católica de Murcia UCAM, Campus de los Jerónimos, Guadalupe 30107, Spain

^c CREA, Centro di ricerca Alimenti e Nutrizione Via Ardeatina 546, 00178-Roma, Italy

ARTICLE INFO

Keywords:

Vegetable coagulant
Milk clotting
Aqueous extract
Clotting activity
Protease
Onopordum tauricum
Taurian thistle

ABSTRACT

In Western and Central Mediterranean countries proteases from wild herbaceous perennial plants commonly known as “thistles” have been used as milk coagulants in cheese-making for centuries. For the first time, the technological and biochemical traits of proteases from cultivated *Onopordum tauricum* Willd. (Taurian thistle, bull cottonthistle) were assessed. The optimal conditions for minimizing the clotting time and the non-specific proteolytic activity were estimated at the highest ($T = 43\text{--}45\text{ }^{\circ}\text{C}$; $[\text{Ca}^{2+}] = 11\text{--}13\text{ mM}$) and the lowest ($T = 35\text{--}39\text{ }^{\circ}\text{C}$; $[\text{Ca}^{2+}] = 5\text{ mM}$) temperature and calcium ion levels in the explored range respectively, thus highlighting the difficulty to set the best operative compromise in the first step of cheesemaking. In the conditions adopted in common cheesemaking practice ($T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\text{pH} = 6.5$) 1 mL of reconstituted extract from cultivated thistles coagulated 10 mL of ewe’s and goat’s milk in 114–146 and 129–167 s, respectively, and 1 mL of reconstituted extract from spontaneous thistles coagulated 10 mL of ewe’s and goat’s milk in 232–294 and 428–621 s, respectively, while no significant differences in the non-specific proteolytic activity between cultivated and spontaneous *O. tauricum* extracts were observed. The purified enzyme (tauricosin) was identified as an aspartic protease made up of two sub-units with molecular weights of 32 and 9.6 kDa, respectively. Experimental data encouraged the exploitation of *O. tauricum* as a new and sustainable non-food crop in marginal and rainfed lands of Mediterranean countries, thus reducing the potential biodiversity losses due to wild collection.

1. Introduction

The use of vegetable coagulants in cheesemaking takes utmost importance nowadays, due to the growing demand and the reduced availability of ruminant stomachs (Jacob; Jaros, & Rohm, 2011). Vegetable enzymes from different plant organs (leaves, flowers, stems, fruits) and products (latex) were extensively studied as potential coagulants in the production of cheese (de Farias et al., 2020, Colombo et al., 2018, Liburdi, Boselli, Giangolini, Amatiste, & Esti, 2019, Shah, Mir, & Paray, 2014, Mazorra-Manzano et al., 2013). Ewe’s and goat’s cheeses produced with vegetable rennet are widely popular in Spain and Portugal (Torta del Casar, Los Ibores, Serpa, Azeitão, Nisa, Évora, Casar

de Cáceres, Serra de Estrela, Los Pedroches, La Serena, Castelo Branco, Flor de Guía) (Reis, & Malcata, 2011, Roseiro, Barbosa, Ames, & Wilbey, 2003, Tejada, & Fernández-Salguero, 2003, Fernández-Salguero, Tejada, & Gómez, 2003) and some of them gained the European Protected Designation of Origin (POD), thanks to their unique taste, aroma, and flavour (EUR-Lex. Council Regulation, 2006, Barracosa, Rosa, Barros, & Pires, 2018). “Caciofiore” is a small-batch cheese manufactured in Central Italy regions with raw ewe’s milk, which represents a magnificent model of Mediterranean soft cheese made with vegetable coagulants (Cardinali et al., 2017, Cardinali et al., 2016).

Among the plant proteases, the enzymatic activities extracted from thistles belonging to the genus *Cynara* deserve a special mention, being

Abbreviations: MCT, milk clotting time; PA, proteolytic activity; AP, aspartic protease; casein-FITC, casein fluorescein isothiocyanate; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; E64, N-[N-(L-3-trans-carboxyoxiran-2-carbonyl)-L-leucyl]-agmatine.

* Corresponding authors.

E-mail addresses: m.gasparrini@univpm.it (M. Gasparrini), m.mozzon@univpm.it (M. Mozzon).

¹ Contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111592>

Received 12 April 2022; Received in revised form 15 June 2022; Accepted 27 June 2022

Available online 29 June 2022

0963-9969/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

the most significant plants to produce vegetable rennets (Tejada, Vioque, Gómez, & Fernández-Salguero, 2008b, Gomes et al., 2019, Ordiales et al., 2013, Silva, & Malcata, 2005). The milk clotting activity of thistle extracts is due to several types of aspartic proteases (APs). The most studied are APs from *C. cardunculus*, which produce cheeses with a creamy, soft texture and slightly piquant aroma (Alavi; & Momen, 2020). Cheese-making trials have demonstrated the suitability of these proteases for the manufacture of cheeses without the defects (e.g., bitterness; excessive softness of the cheese paste) typically occurring in cheeses produced with plant-based rennet substitutes, due to an excessive non-specific proteolytic activity (Agboola; Chan; Zhao, & Rehman, 2009, Ben Amira, Besbes, Attia, & Blecker, 2017). To date, nine APs were isolated from *C. cardunculus* flowers, six cardosins (Verfissimo et al., 1996, Sarmiento et al., 2009) and three cyprosins (Cordeiro, Pais, & Brodelius, 1994). Cyprosins and cardosins A and B were found to be endowed with milk clotting activity (Heimgartner, Pietrzak, Geertsen, Brodelius, Figueiredo, & Pais, 1990, Silva, & Malcata, 2005). *C. cardunculus* APs are the products of a multigene family (Pimentel, Van Der Straeten, Pires, Faro, & Rodrigues-Pousada, 2007) and share a similar primary structure but different activities and substrate specificity. All of them are glycosylated heterodimers, exhibiting a marked microheterogeneity in terms of isoelectric point and molecular mass, which were ascribed to the proteolytic processing of the precursors during the activation process (Sarmiento et al., 2009). APs with milk clotting activity were also purified from *C. scolymus*. They share a high degree of sequence homology with *C. cardunculus* proteases, the same optimum acidic pH, and a similar proteolytic activity on the various milk caseins (Llorente, Brutti, & Caffini, 2004, Chazarra, Sidrach, López-Molina, & Rodríguez-López, 2007). Proteases with milk clotting activity were also characterized in other genera within the tribe *Cynareae*, like *Centaurea calcitrapa* (Domingos et al., 1998) and *Cirsium vulgare* (Lufrano et al., 2012).

The chemical, biochemical and technological traits of many other thistle extracts were studied. Particularly, *Onopordum* spp. contain, in their flower heads, aspartic proteases with high milk-clotting activity. A few studies reported the performance of the enzymes of *O. acanthium* L. and *O. tauricum* Danin (Brutti; Pardo, Caffini, & Natalucci, 2012, Tamer, & Mutlu, 1994, Tamer, 1993), but only one research investigated the clotting properties of *O. tauricum* Willd. (Taurian thistle, bull cotton-thistle) on different milks (ewe, goat, and cow) and reported a milk clotting activity only 5–15 times lower than conventional calf rennet, when assayed in the same conditions (Mozzon et al., 2020). *O. tauricum* is a wild biennial or annual herb characterized by a high spiny stem, up to two meters tall, triangular-lobed leaves and a hemispherical inflorescence (4–6 cm in diameter) provided with pink-purple tubular flowers. Taurian thistles are well adapted to the xerothermic conditions of Mediterranean regions, thus suggesting their exploitation as cultivated non-food crop in marginal lands. In a recent paper, Zenobi et al. (2021) described the effect of different plant densities on the development and differentiation of cultivated *O. tauricum*: a significantly higher production of flower heads (7926–9555 vs 1734–2290 g/m²) and tubular flowers (3500 vs 800 g/m²) per unit of surface than *Cynara cardunculus* L. confirmed the potentialities of *O. tauricum* as herbaceous crop for vegetable rennet production in a Mediterranean environment with low inputs. The germination ecology of two different accessions of wild thistle seeds subjected to different pre-treatments (gibberellic acid, vernalization) was also investigated (Zitti, Di Cecco, Casavecchia; Martino, & Aquilanti, 2021).

Based on the above premises, in this study we compared the technological properties (milk clotting activity, non-specific proteolytic activity) and the mineral composition of crude extracts from spontaneous and cultivated *O. tauricum* plants and collected new data about the biochemical characterization of the purified protease, with the aim of implementing a new sustainable non-food cropping system in Mediterranean rainfed areas, thus contributing to the reduction of potential biodiversity losses due to the wild plant collection.

2. Material and methods

2.1. Vegetable material and crude extract preparation

Flower heads of wild *O. tauricum* plants were collected in July 2020, along the fringes of Monti Sibillini National Parks, Central Italy (municipality of Visso, Cupi hamlet; 42°59'56.8"N 13°06'53.5"E; 980 m a.s.l.). Thistle seeds collected in 2019 in the same place were sown in February 2020 in a greenhouse, transplanted in a silty-clay soil site located at the Pasquale Rosati experimental farm of the Università Politecnica delle Marche (municipality of Agugliano; 43°32' N 13°22' E; 100 m a.s.l.; slope gradient 10%) in February 2020, and harvested in July 2020, according to Zenobi et al (2021). Tubular flowers were manually separated from wild and cultivated thistle flower heads and macerated in demineralized water, according to the procedure described in Mozzon et al (2020). Aqueous extracts were then freeze-dried in a benchtop equipment (VirTis Advantage, Steroglass S.r.l., Perugia, Italy), stored at –20 °C and reconstituted with demineralized water 1:10 w/v at the time of use. Weights of fresh flowers and dried extracts were recorded to calculate the extract yields.

2.2. Protein content

The total protein content of the reconstituted extracts was determined according to the colorimetric method originally developed by Bradford (1976). Details are given in Mozzon et al (2020).

2.3. Mineral composition

Minerals (Ca, P, Na, K, Mg, Zn and Mn) of the aqueous crude extracts from wild and cultivated *O. tauricum* were determined according to AOAC (2002) method. Briefly, 0.3 g of samples were ashed in the furnace at 525 °C for 16 h. After mineralization, samples were solubilized in 1 mL HNO₃ 65% and then to a final volume of 50 mL HNO₃ 1% (v/v) with 0.1% (w/v) CsCl to avoid sodium and potassium ionisation and with LaCl₃ 0.1% (w/v) for Ca and Mg detection. Ca, Na, K, Mg, Zn and Mn were detected by an atomic absorption spectrometer AAnalyst 300 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA), while P was measured at 400 nm by an UV-1800 spectrophotometer (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan).

2.4. Experimental design

The response surface methodology (RSM) approach was used to study the relationships between three independent factors (temperature, pH, Ca ions concentration) and the performance of reconstituted thistle extracts on raw milk of different origin (clotting activity) and on modified casein-based substrate (non-specific proteolytic activity). Each independent variable was selected at three levels, based on preliminary trials: 35, 40 and 45 °C for temperature, 5.0, 5.5 and 6.0 for pH, and 5, 10 and 15 mM for Ca ions concentration. The D-optimal criterion was used to get the best compromise between the amount of useful information and the number of experiments. The software (see Statistical analysis paragraph) generated a total of thirteen runs that were carried out in double (Supplementary Tables A1 and A2). The order of the experiments was fully randomized to minimize the effects of unexplained variability.

2.5. Milk clotting activity assay

Crude ewe's and goat's milk were collected from a local farm and transferred to the laboratories of Università Politecnica delle Marche, where they were immediately skimmed by centrifugation (5000g, 35 °C, 10 min) and freeze-dried. For clotting tests, milk powders were re-dissolved in buffer solutions (pH 5.0, 5.5, and 6.0), based on their dry matter contents which were 14 and 11% w/w for ewe's and goat's milk,

respectively. The buffers were prepared from a sodium acetate 100 mM stock solution and adjusting the pH to the desired value by the addition of acetic acid. A test tube containing 5 mL of reconstituted milk was previously thermostated in a M20 model water bath (Lauda GmbH, Königshofen, Germany). A calcium chloride (Sigma-Aldrich, Milan, Italy) solution (500 g/L) was added to the substrate to achieve the desired final concentration without any significant changes in the whole substrate volume (5–15 μ L). Finally, 500 μ L of reconstituted *O. tauricum* extract were added to the mixture and the time needed for first flocks appeared (milk clotting time, MCT) on the tube wall was recorded.

2.6. Proteolytic activity assay

The proteolytic activity of the reconstituted *O. tauricum* extract was measured on casein-fluorescein isothiocyanate (casein-FITC) through a continuous fluorescent assay adapted from Twining (1984). The reaction mixture consisted of 40 mM sodium acetate buffers (pH 5.0, 5.5, and 6.0), 0.1 mg/ml casein-FITC type III from bovine milk (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and calcium chloride 5, 10 and 15 mM in a final volume of 200 μ L. Following the addition of the sample (1 μ g) to be analysed, the fluorescence was continuously monitored at 35, 40 and 45 $^{\circ}$ C, using a Synergy HT microplate reader equipped with 485 and 528 nm excitation and emission filters, respectively. One Fluorescence Unit (FU) was defined as the amount of enzyme that produces an increase of 1 Unit of fluorescence per minute under the assay conditions. The casein-FITC based assay was also used to monitor the purification of the protease and to characterize the purified enzyme. The effects of pH and temperature on the proteolytic activity of the purified enzyme were also assayed by using bovine milk Na-caseinate as substrate. To this end, the pure enzyme was incubated with 2% caseinate (w/v) in sodium phosphate buffer 0.1 M at the indicated pH values and temperatures. At different times aliquots were withdrawn and the reaction was stopped by adding 5% trichloroacetic acid at a 1:2 ratio (v/v) (Silva et al., 2005). After centrifugation at 16000 \times g for 5 min, the absorbance of the supernatant was measured at 280 nm and the initial rate of the reaction was calculated. One Caseinolytic Unit (CU) was defined as the amount of enzyme that produces an increase of one absorbance unit per minute at 280 nm under the assay conditions.

2.7. Enzyme purification

About 15 g of fresh flowers manually separated from cultivated plants were homogenized with Ultra-turrax[®] equipment (IKA-Werke GmbH & Co., Staufen, Germany) in 0.1 M sodium acetate buffer pH 5.5 (buffer A), at a 1:5 ratio (w/v), at 20000 rpm for 2 min four times, with 2 min intervals on ice. The homogenate was centrifuged at 11000 \times g for 30 min at 4 $^{\circ}$ C and the supernatant, referred as the crude extract, was made 60% saturated with ammonium sulphate. After stirring for 20 min at 4 $^{\circ}$ C, the suspension was centrifuged as above. The pellet was resuspended in 6 mL of buffer A and, after centrifugation as above, the supernatant was desalted using a PD-10 column containing Sephadex G25 resin (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) equilibrated and eluted with 0.025 M sodium acetate buffer pH 5.5 (buffer B). The sample (1 mL) was loaded onto a Mono Q column (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) equilibrated with buffer B. After a washing step with the same buffer, elution was performed with a linear gradient of NaCl from 0 to 0.5 M in buffer B. In an alternative elution procedure, after a washing step with buffer B containing 0.15 M NaCl, elution was performed with a linear gradient of NaCl from 0.15 to 0.3 M in buffer B. The final preparation was stored at -20° C. SDS-PAGE and Tricine SDS-PAGE were performed according to Laemmli (1970) and Schagger (2006), respectively.

2.8. Molecular and enzymatic properties of purified protease

The molecular mass of the final preparation was estimated by gel filtration chromatography on a Superose 12 10/300 GL column (GE

Healthcare, Chicago, IL, USA) equilibrated and eluted with 25 mM sodium acetate buffer pH 5.5 containing 0.3 M NaCl. The effect of pH and temperature on the proteolytic activity of the purified enzyme was determined with bovine caseinate and bovine casein-FITC as the substrates. For thermal stability, the purified protease was incubated at 45 $^{\circ}$ C and 55 $^{\circ}$ C. Residual activity was measured using the casein-FITC assay at pH 5.5 and 37 $^{\circ}$ C. The effect of known proteases' inhibitors on the proteolytic activity was evaluated by preincubating the purified enzyme for 30 min at 37 $^{\circ}$ C in presence of 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 0.1 mM pepstatin A, or 0.1 mM E-64. The residual activity was measured with the casein-FITC assay at pH 5.5 and 37 $^{\circ}$ C. To analyse the proteolytic activity of the pure enzyme on various caseins, commercial bovine α -, β - and κ -casein (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were dissolved in 0.1 M sodium phosphate buffer pH 6.2 and incubated with the purified enzyme or calf rennet as control, at 37 $^{\circ}$ C for 60 min. The mixtures consisted of 0.7 mg/ml of each casein and 0.01 mg/ml of enzyme or rennet. After 0 and 60 min of incubation, aliquots were subjected to SDS-PAGE on 15% acrylamide gel.

2.9. Statistical analysis

The software JMP Version 11.0.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) was used to both design the experimental plan and analyse the results of clotting and proteolytic assays. A second-order response surface was used to fit the milk clotting and proteolytic activities data matrices. The statistical significance of the model was assessed by analysis of variance (ANOVA).

3. Results and discussion

3.1. Characterization of aqueous extracts

The total protein content of the reconstituted extracts was 0.846 and 0.668 μ g/ μ L for wild and cultivated flowers, respectively. Those values were much lower than previously observed in spontaneously grown plants collected in 2019 (Mozzon et al., 2020), even if the dry extract yields (4.60 and 4.36 g/100 g of fresh flowers for wild thistle population and cultivated plants, respectively) were of the same magnitude of 2019 data. Consequently, the experiments on extracts prepared from plants collected in the summer of 2020 were conducted with much higher substrate/enzyme ratios (697–883 and 426–539 for ewe's and goat's milk, respectively), based on the protein contents of the skimmed milks (5.9% w/w and 3.6% w/w for ewe's and goats' milk, respectively) and the volume of extracts used (500 μ L). Annual variations in the climatic conditions could significantly limit the application of wild thistles for cheesemaking, while agronomic practices could buffer and/or compensate for them, thus increasing the interest in the cultivation of Taurian thistles.

The contents of macro and micro elements in aqueous extracts of spontaneous and cultivated *O. tauricum* were summarised in Table 1. According to these results, the aqueous extract from cultivated plants showed a higher content of macro elements ($p < 0.05$) than the wild

Table 1
Mineral composition (mg/100 g dry weight) of aqueous extract from cultivated and wild *Onopordum tauricum* (Willd.).

Minerals	Cultivated	Wild
Ca	220.2 \pm 2.1 ^a	190.5 \pm 2.5 ^b
P	844.5 \pm 9.8 ^a	761.3 \pm 25.7 ^b
Na	127.1 \pm 1.0 ^a	41.8 \pm 2.3 ^b
K	6871.2 \pm 97.2 ^a	5347.8 \pm 192.8 ^b
Mg	150.4 \pm 2.3 ^a	87.0 \pm 1.2 ^b
Zn	2.6 \pm 0.2	2.9 \pm 0.1
Mn	0.8 \pm 0.0	0.8 \pm 0.0

Different superscript letters mean significant differences ($p < 0.05$). Data are mean \pm standard deviation of three experiments.

thistles, while no differences could be detected for micro elements (Zn and Mn). The differences in mineral contents could be attributed to different growing systems, growing conditions as well as differences in plant age. Artichoke flower heads also represent valuable sources of minerals, showing in particular K and Ca (Ceccarelli et al., 2010), however, there are very few works about the mineral composition of cardoons' extracts. Biel, Witkiewicz, Piątkowska, & Podsiadło (2020) in commercial leaf extracts of artichoke (*Cynara scolymus*) found the same order of magnitude for minerals with the only exception for K (506.3 mg/100 of dry weight), absorbed most by artichoke plants during their growing cycles. The plant parts are sources of minerals but there are differences regarding their minerals content: in particular, leaves and heads are rich in K and Ca while stalks are rich in Na (Petropoulos, Pereira, Tzortzakakis, Barros, & Ferreira, 2018). According to some authors (Ben Amira et al., 2018) the calcium abundance in flowers could be attributed to the plant absorption during the maturation cycle.

3.2. Milk clotting activity

The clotting tests were conducted on skimmed milks to reduce foaming and better catch the beginning of flocculation (Mozzon et al., 2020). The capability of proteases to specifically hydrolyse the Phe₁₀₅-Met₁₀₆ bond of κ -casein, thus causing the destabilization of casein micelles, is a key aspect to assess a potential substitute of conventional animal rennets. Despite the number of independent variables affecting the clotting performance of proteases, most of the published studies analysed the effect of one factor at a time while keeping constant all the others, thus disregarding the possible interactions among them (de Farias et al., 2020, Liburdi et al., 2019, Llorente et al., 2004, Chazarra et al., 2007). Therefore, a multivariate approach and a second order polynomial model equation were used to reveal potential interactive effects among the experimental variables and to predict the optimal conditions for milk clotting and the best performance of crude extracts. A standard least square regression method was used to fit data from the experimental design and estimate the parameters of the mathematical models. The responses at each design point, the statistical significance of the regression coefficients, and the response surface 3D plots were provided in the Supporting Information (Supplementary Tables A3 and A4, Supplementary Figures A1-A3). The agreement between the predicted R² (measure of the reliability to predict the response, i.e., MCT) and the adjusted R² (measure of the quality of data fitting) was used as a global quality indicator of the polynomial models: only the clotting of ewe's milk by aqueous extract from cultivated thistles showed a significant ($p < 0.05$) reliability (Table 2). The mutual interactions between each pair of factors were found to be not significant. However, the clotting properties of vegetable extracts were affected by both the kind of milk and the kind of thistles (wild vs cultivated): the clotting properties of *O. tauricum* extracts in goat's milk were significantly affected only by pH while the other two factors (temperature and Ca ion concentration) affected the response (MCT) of wild thistle extract; in ewe's milk, all the three linear factors showed a

significant influence in the clotting performance of cultivated thistle extract, while the temperature was not significant in describing the behaviour of wild thistle extract. The independent factors were analysed by using the desirability function to estimate the best conditions for minimizing the clotting time (Table 3). In all the milk/coagulant systems, the optimal temperature for clotting was the highest (45 °C) or close to the highest (43 °C) in the range explored (35–45 °C) and the optimal pH value (5.0–5.5) was the lowest in the actual range studied (5.0–6.0). These results were consistent with previously published data on *O. tauricum* aqueous extracts (Mozzon et al., 2020). The optimal Ca ion concentrations were 11–13 mM, higher than the Ca levels used in most of the published studies on the clotting performance of vegetable rennets (Mozzon et al., 2020), thus confirming the need of Ca fortification to improve the clotting performance of thistle proteases. In the optimal conditions (T = 43–45 °C; pH = 5.0–5.5; [Ca²⁺] = 11–13 mM), the clotting performance (predicted MCTs shown in Table 3) of cultivated thistles extract was 1.7 and 2.0 times better than wild thistles extract in ewe's and goat's milk, respectively. Those data could be considered even more favourable for cultivated plants by considering the total protein content of the reconstituted extracts. The optimal factors to minimize the clotting time of thistle extracts were far from parameters adopted in common cheesemaking practice. Therefore, in the

Table 3
Optimal conditions to minimize the milk clotting time (MCT) and the proteolytic activity (PA).

	T (°C)	[Ca ²⁺] (mM)	pH (Units)	Predicted MCT (sec)	Desirability	Measured MCT (sec) ¹
Ewe's milk + RE_st	45	12	5.0	67	0.9158	70
Ewe's milk + RE_ct	45	12	5.0	39	0.9877	38
Goat's milk + RE_st	45	13	5.5	98	0.9863	95
Goat's milk + RE_ct	43	11	5.0	49	0.9871	50
Modified casein + RE_st	35	5	5.0	4.7	0.8680	4.6
Modified casein + RE_ct	39	5	5.0	2.9	0.9016	3.0

¹ average value of two replicates. [Ca²⁺], calcium chloride concentration. FU, fluorescence units. RE_st, reconstituted extract of *O. tauricum* flowers spontaneously grown up. RE_ct, reconstituted extract of cultivated thistles.

Table 2
Predicted model equations for the milk clotting time (MCT) and proteolytic activity (PA) responses.

Code	Model ¹	R ²	Adjusted R ²	F Ratio	p-Value
Ewe's milk					
RE_st	MCT = 127.13 + 46.73 (pH) - 40.07 ([Ca ²⁺])	0.9556	0.8223	7.17	0.0662
RE_ct	MCT = 62.26 - 17.29 (T) + 17.83(pH) - 13.19([Ca ²⁺])	0.9907	0.9629	35.57	0.0068*
Goat's milk					
RE_st	MCT = 193.48 - 53.80 (T) - 52.43 ([Ca ²⁺])	0.9561	0.8245	7.26	0.0650
RE_ct	MCT = 75.73 + 24.18 (pH)	0.9345	0.7380	4.76	0.1132
Casein fluorescein isothiocyanate					
RE_st	PA = 18.84 + 11.88 (pH)	0.9918	0.9673	40.47	0.0056*
RE_ct	PA = 14.76 + 11.29 (pH) + 3.59 (T) ² + 2.77 (pH) ²	0.9968	0.9871	102.76	0.0014*

¹ Equations are reported using only the significant factors ($p < 0.05$). [Ca²⁺], calcium chloride concentration. RE_st, reconstituted extract of wild *O. tauricum* flowers. RE_ct, reconstituted extract of cultivated thistles.

prediction profiler all factors were selected as random (temperature T $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$; $[\text{Ca}^{2+}]$ $10 \text{ mM} \pm 0.4$; pH 6.5 ± 0.1) and the predicted MCTs were extrapolated from 20 runs. As expected, all clotting times lengthened in the operative conditions in the cheese factory, but the clotting performance of extracts from wild thistles got worse than those of extracts from cultivated plants (Table 4).

3.3. Proteolytic activity

The measure of the proteolytic activity of vegetable rennets is of paramount importance to optimise the textural and sensory properties of cheeses. In fact, the proper development of the sensory properties of cheese during ripening needs a balanced breakdown of caseins into small peptides and free amino acids, but an excessive non-specific proteolytic activity could result in low curd yields and sensory defects in cheese (bitter flavour, softness) (Tejada, Abellán, Cayuela, Martínez-Cacha, & Fernández-Salguero, 2008a). The involvement of additional proteases, like milk plasmin, might also significantly contribute to proteolysis during ripening and therefore should be taken into consideration (Bastian, & Brown, 1996). An aspartic protease (onopordosin) was previously characterized in *Onopordium acanthium* flowers, showing a milk clotting activity/proteolytic activity ratio better than protease from *C. cardunculus*, thus representing a promising plant coagulant (Brutti et al., 2012). The good agreement between R^2 and adjusted R^2 indicated the high adequacy of the models for describing the behaviour of the PA in different conditions of temperature, pH, and Ca ion level (Table 2). Unlike the clotting activity, the latter factor ($[\text{Ca}^{2+}]$) did not affect the proteolytic performance of both wild and cultivated thistle extracts. Temperature and pH exerted a strong (quadratic) effect on PA of reconstituted extract of cultivated thistles, while pH was the only factor that significantly affected the PA of the reconstituted extract of wild *O. tauricum* flowers. The desirability function showed the pH 5.0 as optimal for both the best clotting performance and the lowest non-specific proteolytic activity (Table 3). However, the optimal conditions for minimizing the PA were estimated at the lowest temperature and $[\text{Ca}^{2+}]$ values in the explored range, thus highlighting the difficulty to set the best operative compromise in the first step of cheesemaking. Anyway, under the above conditions the predicted PA of wild thistle extract was approximately 1.5 times higher than extract from cultivated plants, as shown in Table 3. By fixing factors to operative conditions adopted in common cheesemaking practice (Table 4), the PA of extract from cultivated plants increased by 14–20 times, while the PA of extract from wild plants increased by 9–13 times, leading to no significant differences in the PA at those specific constraints. By comparison, the optimal hydrolytic conditions for *Cynara scolymus* flower extract towards bovine casein were as follows: pH 6.2, temperature $50 \text{ }^\circ\text{C}$, protein concentration 0.023 mg/ml . As a result, a K_m value of 5.66 mg/ml and a V_{max} of 8.47 mUAb/min were reported (Bueno-Gavilá et al., 2020).

Table 4

Predicted milk clotting time (MCT) and proteolytic activity (PA) at specific constraints.

	T ($^\circ\text{C}$)	$[\text{Ca}^{2+}]$ (mM)	pH (Units)	Predicted variable
				MCT (sec)
Ewe's milk + RE_st	34–38	9.4–10.6	6.3–6.7	232–294
Ewe's milk + RE_ct	36–39	9.6–10.8	6.3–6.7	114–146
Goat's milk + RE_st	34–39	9.4–10.9	6.4–6.7	428–621
Goat's milk + RE_ct	36–38	9.7–10.6	6.3–6.7	129–167
				PA (FU/min)
Modified casein + RE_st	35–39	9.7–11.1	6.3–6.8	42.3–62.2
Modified casein + RE_ct	35–38	9.3–10.6	6.3–6.7	40.8–58.3

FU, fluorescence units.

3.4. Purification of protease and molecular properties

The protease responsible for the coagulating activity was purified through the procedure outlined in Table 5. It consisted of an ammonium sulphate precipitation step that removed most of the pigments, at the same time allowing the concentration of the sample; a desalting step through gel filtration; an ionic exchange chromatographic step, which yielded a highly purified enzyme preparation. In the last step, by performing the elution with a gradient of NaCl from 0 to 0.5 M in the equilibration buffer, only one peak with proteolytic and milk clotting activity was obtained that eluted at about 0.25 M NaCl (Fig. 1A). In particular, we found that 0.1 mL of 0.01 mg/ml purified protease was able to coagulate 1 mL of bovine skimmed milk in the presence of 10 mM CaCl_2 , at $45 \text{ }^\circ\text{C}$, in about 8 min. SDS-PAGE analysis of the fractions eluted from the Mono Q column (Fig. 1B) showed the coelution of the proteolytic activity with two bands (indicated by the arrows in the figure), suggesting that they might represent the two subunits of the protease of interest. When the chromatographic step was performed with an elution gradient from 0.15 to 0.3 M NaCl, the protein peak appeared very broad, indicating a marked heterogeneity (Fig. 1C). Tricine SDS-PAGE analysis of different fractions of the peak yielded the same protein pattern and molecular weights of 32 and 9.6 kDa, were calculated for the two bands of interest (Fig. 1D). Gel filtration analyses of the fractions also resulted in a similar molecular mass of about 39 kDa (Fig. 1E). Altogether, these results suggested that the enzyme was a heterodimeric protein. This was in line with the general finding that thistle proteases are heterodimeric proteins. In particular, *C. cardunculus* cardosin A consists of two subunits with MW of 31 and 15 kDa, whereas cardosin B consists of two subunits with MW of 34 and 14 kDa (Veríssimo et al., 1996). Other four cardosins (E, F, G and H) were also characterized, with 29 and 15 kDa subunits (Sarmiento et al., 2009). In *C. scolymus*, five different cynarases with subunits of MW of 30 and 14.4 kDa were described (Llorente et al., 2004). The heterogeneity of the purified protease, as revealed by the ionic-chromatographic step, is a feature common to all thistle proteases so far characterized, that was ascribed to the coexistence of molecular forms of different isoelectric point values (Sarmiento et al., 2009).

3.5. Enzymatic properties of pure protease.

Optimal caseinolytic activity was achieved at pH values ranging from 4.5 to 6.0 (Fig. 2A), which was slightly lower than the optimum pH (5.7–6.0) exhibited by proteases isolated from *C. cardunculus* (Chen, Zhao, & Agboola, 2003) and consistent with the proteolytic activity exhibited by reconstituted extracts on ewe's and goat's milk. The caseinolytic activity showed an optimum temperature at $55 \text{ }^\circ\text{C}$ and rapidly declined at higher temperatures (Fig. 2B). The enzyme thermal stability is shown in Fig. 2C. After 2.5 h at $45 \text{ }^\circ\text{C}$, caseinolytic activity remained unchanged, while it rapidly declined during exposure of the purified enzyme at $55 \text{ }^\circ\text{C}$, with about 50% residual activity after 1 h. The marked thermal stability, as well as the high optimum temperature value displayed by tauricosin were in agreement with those reported for other thistle proteases, like cyprosins and cynarases (Sidrach, García-Cánovas, Tudela, & Neptuno Rodríguez-López, 2005, White, Cordeiro, Arnold, Brodelius, & Kay 1999). A markedly lower optimum temperature (40 $^\circ\text{C}$) was reported for the partially purified protease from *O. acanthium* (Benkahoul, Benchiheub, Bellil, Khelifi, & Maza, 2016). To get insight into the nature of the catalytic type of tauricosin, the effect of serine-, cysteine- and aspartic-inhibitors (PMSF, E-64, pepstatin A) was tested on the caseinolytic activity of the purified enzyme, as described in Materials and Methods. Only pepstatin A was found to inhibit the enzyme, with 89% inhibition observed in the presence of 0.5 mM pepstatin A. These results confirmed that tauricosin was an aspartic acid protease. The degradation pattern of α -, β -, and κ -caseins after 30 min incubation with purified tauricosin was compared to that obtained with rennin after incubation in the same conditions. As shown in Fig. 2D,

Table 5
Purification of tauricosine from cultivated *O. tauricum* flowers.

Step	Total protein ^a (mg)	Total activity ^b (FU)	Specific activity (FU/mg)	Yield (%)	Purification factor
Crude extract	45.8	101	2.2	100	–
AS fractionation	19.2	108	5.6	107	2.6
G25	13.3	98	7.4	97	3.3
Mono Q	0.44	14	31.8	14	14.4

^a Starting from 15 g fresh flowers.

^b The enzymatic activity was assayed using casein-FITC as substrate, at pH 5.5 and 37 °C, as reported in Materials and Methods. FU, fluorescence units.

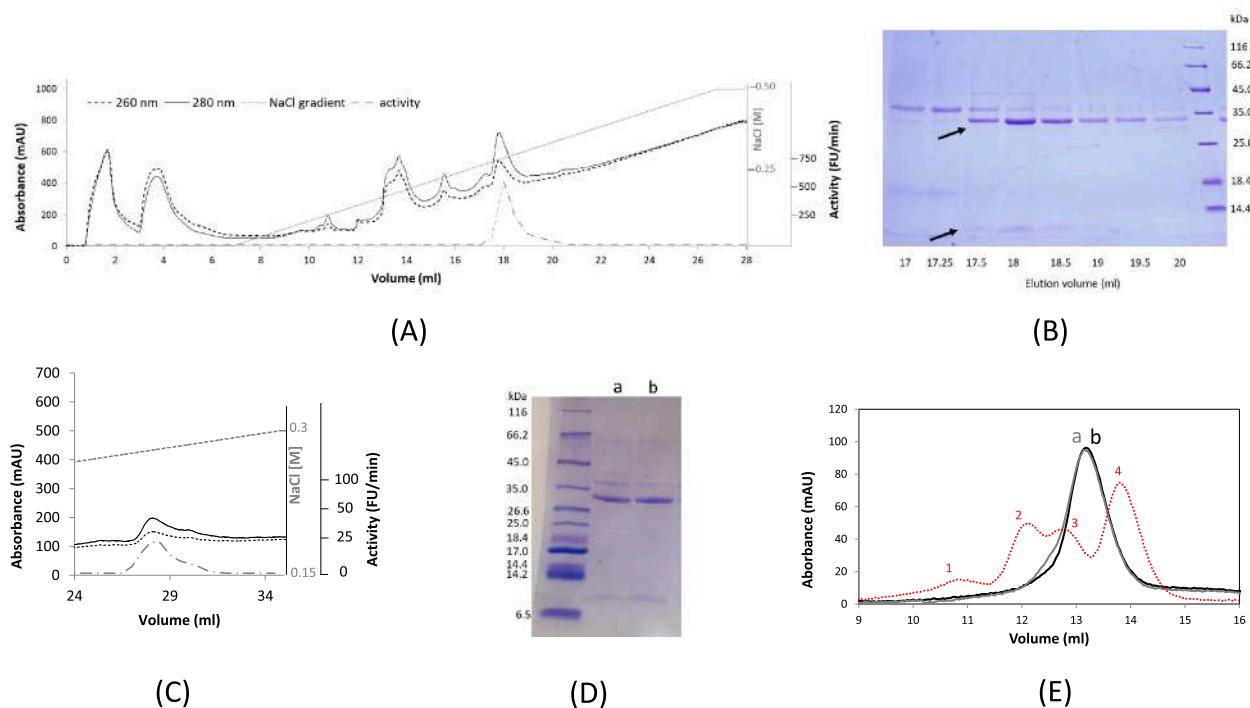


Fig. 1. Purification and molecular properties of tauricosin. Anion-exchange chromatography on the Mono Q column eluted with a linear gradient of NaCl, from 0 to 0.5 M (A). Eluted fractions were analysed by SDS-PAGE, with a 15% polyacrylamide gel (B). Profile of the Mono Q column eluted with a NaCl gradient from 0.15 to 0.3 M (C). Fractions a and b were analysed by Tricine SDS-PAGE (D) and gel filtration chromatography (E) on a Superose 12 column calibrated with (1) dimeric (133 kDa), (2) monomeric (66 kDa) bovine serum albumin, (3) ovalbumin (44 kDa), and (4) carbonic anhydrase (29 kDa).

tauricosin hydrolysed κ -casein similarly to rennin, while it showed a more intense proteolytic activity towards β -casein and α -casein, yielding peptides with lower molecular weight. The caseins degradation profile closely resembles that obtained with cynarases from *C. scolymus* (Chazzarra et al., 2007).

4. Conclusion

In summary, this is the first study to report the technological performance and the biochemical traits of a novel aspartic-type endopeptidase from cultivated *Onopordum tauricum*. The purified enzyme (tauricosin) was a heterodimeric protein made up of two sub-units with molecular weights of 32 and 9.6 kDa, respectively. The crude aqueous extracts prepared from tubular flowers of both spontaneous and cultivated plants showed optimal conditions for clotting ewe's and goat's milk ($T = 43\text{--}45\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\text{pH} = 5.0\text{--}5.5$; $[\text{Ca}^{2+}] = 11\text{--}13\text{ mM}$) far from parameters adopted in common cheesemaking practice. However, in all conditions the cultivated plants provided extracts having better clotting performance than wild thistles. Tauricosin hydrolysed κ -casein similarly to rennin (clotting activity), while it showed a more intense non-specific proteolytic activity towards β - and α -caseins. Lower temperatures ($35\text{ }^{\circ}\text{C}$) and Ca ion levels (5 mM) were needed for minimizing the potentially undesired non-specific PA, thus highlighting the difficulty to set the best operative compromise in the early steps of cheesemaking

(coagulation, curd cutting, whey separation). Furthermore, no significant differences in the PA at operative conditions adopted in common cheesemaking practice were observed between extracts of wild and cultivated thistles. The encouraging technological performance of *O. tauricum* extracts go hand in hand with botanical and agronomic data. Taurian thistle seeds showed a high germination rate (94%) when properly pre-treated (Zitti et al., 2021) and cultivated *O. tauricum* exhibited a significantly higher production of useful biomass (tubular flowers) per unit of surface than the most popular source of vegetable rennets *Cynara cardunculus* (Zenobi et al., 2021), thus confirming the potentialities of *O. tauricum* as an herbaceous crop for vegetable rennet production in the rainfed unfertilized Mediterranean environment. Further studies concerning the rheological properties of curd and cheese together with the chemical, microbiological, and sensory characterization of the final products are needed to provide a full assessment of *O. tauricum* proteases as vegetable rennet.

5. Funding sources

This research was supported by the Italian Ministry of Education, University and Research (MIUR) and part of the PRIMA program supported by the European Union "Valorisation of thistle-curdled CHEESES in Mediterranean marginal areas" (<https://veggiedmedcheeses.com/>).

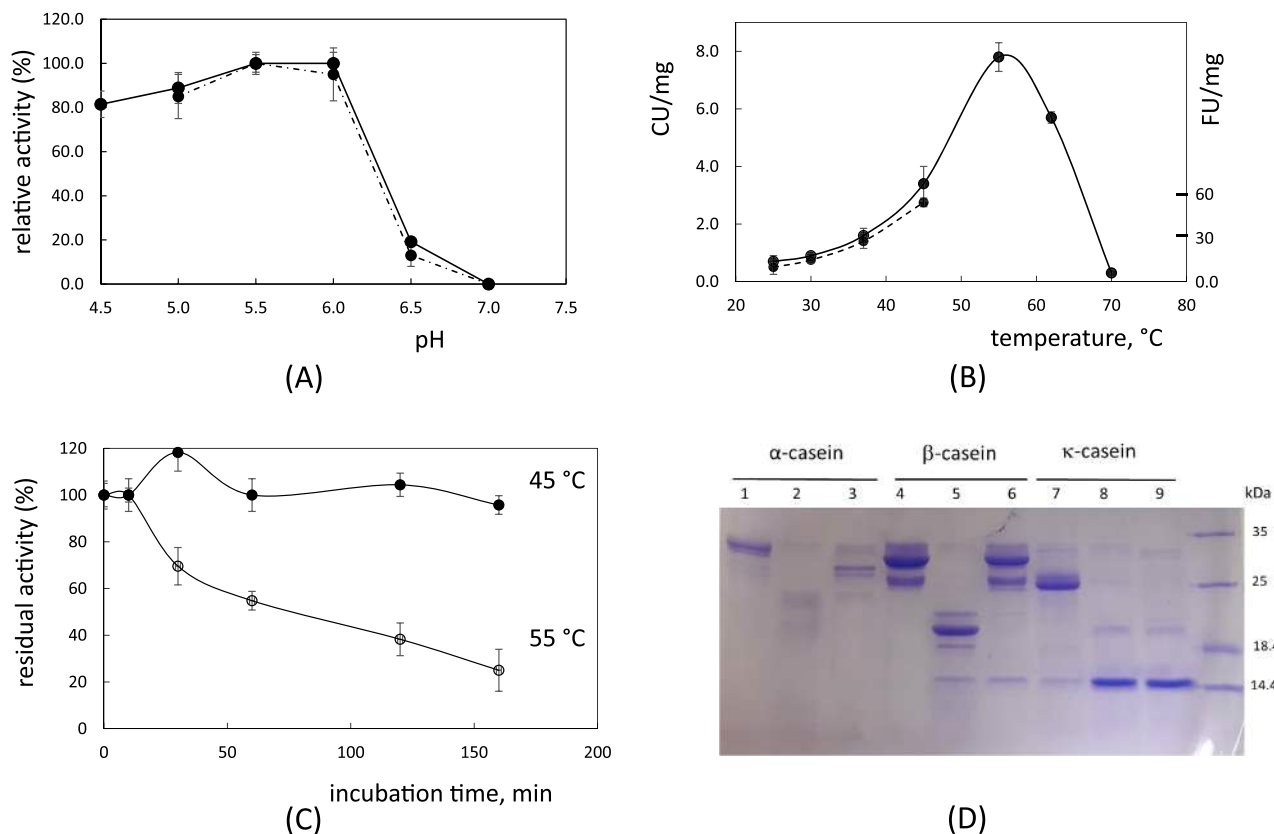


Fig. 2. Enzymatic properties of tauricosin. The proteolytic activities on bovine caseinate (continuous line) and bovine casein-FITC (dotted line) were determined at different pH values at 37 °C (A), and at different temperatures, at pH 5.5 (B). The casein-FITC assay was used at pH values ranging from 5.0 to 7.0 since it has a limited sensitivity at pH 4.5. Likewise, temperatures higher than 45 °C were not tested because out of the temperature working range of the fluorimeter. Thermal stability was determined at pH 5.5 (C). Hydrolysis of different caseins after 0 (lanes 1, 4, 7) and 30 min incubation with tauricosin (lanes 2, 5, 8) or rennin (3, 6, 9) was analysed by SDS-PAGE (D).

CRedit authorship contribution statement

Roberta Foligni: Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Writing – review & editing, Visualization. **Cinzia Mannozi:** Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Writing – review & editing, Visualization. **Massimiliano Gasparrini:** Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Writing – review & editing, Visualization. **Nadia Raffaelli:** Conceptualization, Investigation, Resources, Writing – original draft. **Federica Zamporlini:** Investigation. **Luis Tejada:** Writing – review & editing. **Cindy Bande-De León:** Investigation, Writing – review & editing. **Roberto Orsini:** Investigation. **Pamela Manzi:** Formal analysis, Investigation, Resources, Writing – original draft. **Maria Gabriella Di Costanzo:** Investigation. **Mena Ritota:** Investigation. **Lucia Aquilanti:** Supervision, Project administration, Funding acquisition. **Massimo Mozzon:** Conceptualization, Resources, Writing – original draft.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111592>.

References

- 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(8), 1352–1359. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.03.015>
- Alavi, F., & Momen, S. (2020). Aspartic Proteases from Thistle Flowers: Traditional coagulants used in the modern cheese industry. *International Dairy Journal*, 107. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104709>
- Barracosa, P., Rosa, N., Barros, M., & Pires, E. (2018). Selected cardoon (*Cynara cardunculus* L.) genotypes suitable for PDO cheeses in Mediterranean regions. *Chemistry & Biodiversity*, 15(7). <https://doi.org/10.1002/cbdv.201800110>
- Bastian, E. D., & Brown, R. J. (1996). Plasmin in milk and dairy products: An update. *International Dairy Journal*, 6(5), 435–457. [https://doi.org/10.1016/0958-6946\(95\)00021-6](https://doi.org/10.1016/0958-6946(95)00021-6)
- Ben Amira, A., Besbes, S., Attia, H., & Blecker, C. (2017). Milk-clotting properties of plant rennets and their enzymatic, rheological, and sensory role in cheese making: A review. *International Journal of Food Properties*, 20, S76–S93. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1289959>
- Ben Amira, A., Blecker, C., Richel, A., Arias, A. A., Fickers, P., Francis, F., Besbes, S., & Attia, H. (2018). Influence of the ripening stage and the lyophilization of wild cardoon flowers on their chemical composition, enzymatic activities of extracts and technological properties of cheese curds. *Food Chemistry*, 245, 919–925. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.082>
- Benkhouh, M., Benchiheb, M., Bellil, I., Khelifi, D., & Maza, A. (2016). M. Physical and chemical properties of the acid protease from *Onopordum acanthium*: Comparison between electrophoresis and HPLC of degradation casein profiles. *African Journal of Biotechnology*, 15(9), 331–340.
- Biel, W., Witkovicz, R., Piątkowska, E., & Podsiadło, C. (2020). Proximate composition, minerals and antioxidant activity of artichoke leaf extracts. *Biological Trace Element Research*, 194, 589–595.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brutti, C. B., Pardo, M. F., Caffini, N. O., & Natalucci, C. L. (2012). *Onopordum acanthium* L. (Asteraceae) flowers as coagulating agent for cheesemaking. *LWT - Food Science and Technology*, 45(2), 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.09.001>

- Bueno-Gavilá, E., Abellán, A., Bermejo, M. S., Salazar, E., Cayuela, J. M., Prieto-Merino, D., & Tejada, L. (2020). Characterization of proteolytic activity of artichoke (*Cynara scolymus* L.) flower extracts on bovine casein to obtain bioactive peptides. *Animals*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/ani10050914>
- Cardinali, F., Osimani, A., Taccari, M., Milanović, V., Garofalo, C., Clementi, F., ... Aquilanti, L. (2017). Impact of thistle rennet from *Carlina acanthifolia* All. Subsp. *acanthifolia* on bacterial diversity and dynamics of a specialty Italian raw ewes' milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 255, 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.018>
- Cardinali, F., Taccari, M., Milanović, V., Osimani, A., Polverigiani, S., Garofalo, C., Foligni, R., Mozzon, M., Zitti, S., Raffaelli, N., Clementi, F., & Aquilanti, L. (2016). Yeast and mould dynamics in caciocifore della sibilla cheese coagulated with an aqueous extract of *Carlina acanthifolia* All. *Yeast*, 33 (8), 403–414. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/yea.3168>.
- Ceccarelli, N., Curadi, M., Picciarelli, P., Martelloni, L., Sbrana, C., & Giovannetti, M. (2010). Globe artichoke as a functional food. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 3, 197–201.
- Chazarra, S., Sidrach, L., López-Molina, D., & Rodríguez-López, J. N. (2007). Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus*, L.) flowers. *International Dairy Journal*, 17(12), 1393–1400. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.04.010>
- Chen, S., Zhao, J., & Agboola, S. Isolation and partial characterization of rennet-like proteases from Australian cardoon (*Cynara cardunculus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (10), 3127–3134. <https://doi.org/10.1021/jf025842r>.
- Colombo, M. L., Fernández, A., Cimino, C. V., Liggieri, C., Bruno, M., Faro, C., ... Vairo-Cavalli, S. (2018). Miniature cheeses made with blends of chymosin and a vegetable rennet from flowers of *Silybum marianum*: Enzymatic characterization of the flower-coagulant peptidase. *Food Chemistry*, 266, 223–231. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.007>
- Cordeiro, M. C., Pais, M. S., & Brodelius, P. E. (1994). Tissue-specific expression of multiple forms of cyprosin (aspartic proteinase) in flowers of *Cynara cardunculus*. *Phytochemical Plantarum*, 92(4), 645–653. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1994.tb03035.x>
- de Farias, V. A., da Rocha Lima, A. D., Santos Costa, A., de Freitas, C. D. T., da Silva Araújo, I. M., dos Santos Garruti, D., ... de Oliveira, H. D. (2020). Noni (*Morinda citrifolia* L.) fruit as a new source of milk-clotting cysteine proteases. *Food Research International*, 127. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108689>
- Domingos, A., Xue, Z.-T., Guruprasad, K., Clemente, A., Blundell, T., Pais, M. S., & Brodelius, P. E. (1998). An aspartic proteinase from flowers of *Centaurea calcitrapa*: Purification, characterization, molecular cloning, and modelling of its three-dimensional structure. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 436, 465–472. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5373-1_64
- EUR-Lex. Council Regulation (EC) No. 510/2006 of 20 March (2006) on the Protection of Geographical Indications and Designations of Origin for agricultural products and foodstuffs.
- Fernández-Salguero, J., Tejada, L., & Gómez, R. (2002). Use of powdered vegetable coagulant in the manufacture of ewe's milk cheeses. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(4), 464–468.
- Gomes, S., Belo, A. T., Alvarenga, N., Dias, J., Lage, P., Pinheiro, C., ... Martins, A. P. L. (2019). Characterization of *Cynara cardunculus* L. flower from Alentejo as a coagulant agent for cheesemaking. *International Dairy Journal*, 91, 178–184. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.09.010>
- Heimgartner, U., Pietrzak, M., Geertsen, R., Brodelius, P., Figueiredo, A. C. D., & Pais, M. S. (1990). Purification and partial characterization of milk clotting proteases from flowers of *Cynara cardunculus*. *Phytochemistry*, 29, 1405–1410. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)80090-4](https://doi.org/10.1016/0031-9422(90)80090-4)
- Jacob, M., Jaros, D., & Rohm, H. (2011). Recent advances in milk clotting enzymes. *International journal of dairy technology*, 64(1), 14–33. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00633.x>
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Liburdi, K., Boselli, C., Giangolini, G., Amatiste, S., & Esti, M. (2019). An evaluation of the clotting properties of three plant rennets in the milks of different animal species. *Foods*, 8(12). <https://doi.org/10.3390/foods8120600>
- Llorente, B. E., Brutti, C. B., & Caffini, N. O. (2004). Purification and characterization of a milk-clotting aspartic proteinase from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 8182–8189. <https://doi.org/10.1021/jf049006o>
- Lufrano, D., Faro, R., Castanheira, P., Parisi, G., Veríssimo, P., Vairo-Cavalli, S., Simões, I., & Faro, C. (2012). Molecular cloning and characterization of procirsin, an active aspartic protease precursor from *Cirsium vulgare* (Asteraceae). *Phytochemistry*, 81, 7–18. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.05.028>
- Mazorra-Manzano, M. A., Perea-Gutiérrez, T. C., Lugo-Sánchez, M. E., Ramírez-Suarez, J. C., Torres-Llanez, M. J., González-Córdova, A. F., & Vallejo-Cordoba, B. Comparison of the milk-clotting properties of three plant extracts. *Food Chemistry*, 141 (3), 1902–1907. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.042>
- Mozzon, M., Foligni, R., Mannozi, C., Zamporlini, F., Raffaelli, N., & Aquilanti, L. (2020). Clotting properties of *Onopordum tauricum* (Willd.) aqueous extract in milk of different species. *Foods*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/foods9060692>
- Official Methods of Analysis (OMA); ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL COLLABORATION (AOAC) INTERNATIONAL: Arlington, VA, USA, 2002.
- Ordiales, E., Benito, M. J., Martín, A., Fernández, M., Hernández, A., & De Guía Córdoba, M. (2013). Proteolytic Effect of *Cynara cardunculus* Rennet for use in the elaboration of "Torta del Casar" cheese. *Journal of Dairy Research*, 80(4), 429–438. <https://doi.org/10.1017/S0022029913000411>
- Petropoulos, S. A., Pereira, C., Tzortzakis, N., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). Nutritional value and bioactive compounds characterization of plant parts from *Cynara cardunculus* L. (Asteraceae) cultivated in central Greece. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00459>
- 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. *The FEBS Journal*, 274(10), 2523–2539. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05787.x>
- Reis, P. J. M., & Malcata, F. X. (2011). Current state of Portuguese dairy products from ovine and caprine milks. *Small Ruminant Research*, 101(1–3), 122–133. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.09.032>
- Roseiro, L. B., Barbosa, M., Ames, J. M., & 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), 76–85. <https://doi.org/10.1046/j.1471-0307.2003.00080.x>
- Sarmento, A. C., Lopes, H., Oliveira, C. S., Vitorino, R., Samyn, B., Sergeant, K., ... Barros, M. T. (2009). Multiplicity of aspartic proteinases from *Cynara cardunculus* L. *Planta*, 230(2), 429–439. <https://doi.org/10.1007/s00425-009-0948-9>
- Schägger, H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*, 1(1), 16–22. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.4>
- Shah, M. A., Mir, S. A., & Paray, M. A. (2014). Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: A review. *Dairy Science & Technology*, 94(1), 5–16. <https://doi.org/10.1007/s13594-013-0144-3>
- Sidrach, L., García-Cánovas, F., Tudela, J., Neptuno Rodríguez-López, J. (2005) Purification of cynarases from artichoke (*Cynara scolymus* L.): Enzymatic properties of cynarase A. *Phytochemistry*, 66 (1), 41–49. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.10.005>
- Silva, S. V., & Malcata, F. X. (2005). Studies pertaining to coagulant and proteolytic activities of plant proteases from *Cynara cardunculus*. *Food Chemistry*, 89(1), 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.074>
- Tamer, I. M. (1993). Identification and partial purification of a novel milk clotting enzyme from *Onopordum tauricum*. *Biotechnology Letters*, 15(4), 427–432. <https://doi.org/10.1007/BF00128289>
- Tamer, I. M., & Mutlu, M. (1994). A New Approach to modelling enzyme kinetics by a novel enzyme from *Onopordum tauricum* and powdered calf rennet. *The Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal*, 56(1), B87–B90. [https://doi.org/10.1016/0923-0467\(94\)87037-3](https://doi.org/10.1016/0923-0467(94)87037-3)
- Tejada, L., & Fernández-Salguero, J. (2003). Chemical and microbiological characteristics of ewes' milk cheese (Los Pedroches) made with a powdered vegetable coagulant or calf rennet. *Italian Journal of Food Science*, 15(1), 125–131.
- Tejada, L., Abellán, A., Cayuela, J. M., Martínez-Cacha, A., & Fernández-Salguero, J. (2008a). Proteolysis in goats' milk cheese made with calf rennet and plant coagulant. *International Dairy Journal*, 18 (2), 139–146. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.08.010>
- Tejada, L., Vioque, M., Gómez, R., & Fernández-Salguero, J. (2008). Effect of lyophilisation, refrigerated storage and frozen storage on the coagulant activity and microbiological quality of *Cynara cardunculus* L. extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(8), 1301–1306. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3193>
- Twining, S. S. (1984). Fluorescein isothiocyanate-labeled casein assay for proteolytic enzymes. *Analytical Biochemistry*, 143 (1), 30–34. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90553-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90553-0)
- Veríssimo, P., Faro, C., Moir, A. J. G., 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 of Biochemistry*, 235(3), 762–768. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.00762.x>
- White, P. C., Cordeiro, M. C., Arnold, D., Brodelius, P. E., & Kay, J. (1999). Processing, activity, and inhibition of recombinant cyprosin, an aspartic proteinase from cardoon (*Cynara cardunculus*). *Journal of Biological Chemistry*, 274 (24), 16685–16693. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.274.24.16685>
- Zenobi, S., Fiorentini, M., Aquilanti, L., Foligni, R., Mannozi, C., Mozzon, M., ... Orsini, R. (2021). Effect of planting density in two thistle species used for vegetable rennet production in marginal Mediterranean areas. *Agronomy*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/agronomy11010135>
- Zitti, S., Di Cecco, V., Casavecchia, S., Martino, L. D., & Aquilanti, L. (2021). Seed germination reports for *Onopordum tauricum* (Asteraceae). *Flora Mediterranea*, 30, 421–423. <https://doi.org/10.7320/FLMEDIT30.421>

5.1.2. Clotting and proteolytic activity of freeze-dried crude extracts obtained from wild thistles *Cynara humilis* L. and *Onopordum platylepis* Murb.

Article

Clotting and Proteolytic Activity of Freeze-Dried Crude Extracts Obtained from Wild Thistles *Cynara humilis* L. and *Onopordum platylepis* Murb.

Cindy Bande-De León ^{1,*}, Laura Buendía-Moreno ^{2,*}, Adela Abellán ¹, Pamela Manzi ³, Bouthaina Al Mohandes Dridi ⁴, Ismahen Essaidi ⁴, Lucia Aquilanti ⁵ and Luis Tejada ¹

- ¹ Department of Human Nutrition and Food Technology, Universidad Católica de Murcia-UCAM, Campus de los Jerónimos, 30107 Murcia, Spain; aabellan@ucam.edu (A.A.); ltejada@ucam.edu (L.T.)
- ² Department of Food Science and Technology, Veterinary Faculty, University of Murcia, 30071 Murcia, Spain
- ³ CREA, Centro di Ricerca Alimenti e Nutrizione, Via Ardeatina 546, 00178 Rome, Italy; pamela.manzi@crea.gov.it
- ⁴ Research Laboratory of Agrobiodiversity and Ecotoxicology LR21AGR02, High Agronomic Institute of Chott-Mariem, University of Sousse, Sousse 4042, Tunisia; bouthaina2@yahoo.com (B.A.M.D.); saidi.ismahen@gmail.com (I.E.)
- ⁵ Department of Agricultural, Food and Environmental Sciences, Università Politecnica delle Marche, Via Brecce Bianche, 60131 Ancona, Italy; l.aquilanti@staff.univpm.it
- * Correspondence: cmbande@ucam.edu (C.B.-D.L.); laura.buendia@um.es (L.B.-M.)
- † These authors contributed equally to this work.



Citation: Bande-De León, C.; Buendía-Moreno, L.; Abellán, A.; Manzi, P.; Al Mohandes Dridi, B.; Essaidi, I.; Aquilanti, L.; Tejada, L. Clotting and Proteolytic Activity of Freeze-Dried Crude Extracts Obtained from Wild Thistles *Cynara humilis* L. and *Onopordum platylepis* Murb. *Foods* **2023**, *12*, 2325. <https://doi.org/10.3390/foods12122325>

Academic Editors: Piero Franceschi and Paolo Formaggioni

Received: 13 May 2023

Revised: 1 June 2023

Accepted: 8 June 2023

Published: 9 June 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The rising interest in finding alternatives to animal rennet in cheese production has led to studying the technological feasibility of using and exploiting new species of herbaceous plants. In this research work, and for the first time, freeze-dried extracts from *Cynara humilis* L. (CH) and *Onopordum platylepis* Murb. (OP) were studied for mineral and protein content, and their clotting and proteolytic activity were compared to those of *Cynara cardunculus* L. (CC). The effect of extract concentration (5–40 mg extract/mL), temperature (20–85 °C), pH (5–8), and CaCl₂ concentration (5–70 mM) on the milk clotting activity (MCA) of CC, CH and OP extracts was evaluated. The MCA values were significantly higher in CC at the same extract concentration. The extract that showed the most significant increase in clotting activity due to increased temperature was OP, with maximum activity at 70 °C. The pH value for maximum milk clotting was 5.0 for both CC and CH, whereas, in the case of OP, the pH value was 5.5. CaCl₂ enhanced the clotting capacity of the extracts, particularly for OP and CH. Furthermore, proteolytic activity (PA) and the hydrolysis rate increased with increasing time and enzyme concentration, with CC being the extract that achieved the highest caseinolytic activity.

Keywords: milk clotting activity; vegetable coagulant; proteolytic activity

1. Introduction

The enzymatic clotting of milk is an essential step in most cheesemaking processes. One of the main proteases responsible for this coagulation is chymosin, which is present in ruminant rennet and has been used for centuries by the dairy industry to manufacture different types of cheese [1].

Most of the commercial animal rennet used in dairies comes from recombinant sources, while only 20–30% of it is of natural origin [2]. The worldwide increase in cheese production has led to a decrease in the supply of animal rennet, thus increasing the demand for new coagulant substitutes, such as plant-derived proteases [1].

These proteases are obtained via maceration in water of different plant sections or organs (seeds, flowers, fruits, rhizomes, etc.) and have a high potential for use as milk coagulants to manufacture cheese, replacing animal rennet [3–7].

Numerous studies have been carried out on these plant enzymes obtained from aqueous extracts, such as those derived from papaya (papain), pineapple (bromelain) [8,9], and other plants, whose enzymes are characterised by a proteolytic to clotting activity ratio that is not sufficiently high or proteolytic activity that is excessively high for the production of commercial cheeses [10]. In addition, these vegetable coagulants have certain limitations, mainly related to the texture and sensory quality of the produced cheeses [3].

However, cheeses made with plant proteases from the genus *Cynara* L. have a smooth, creamy texture and exquisite flavour, thus explaining why these perennial herbaceous plants have been used since ancient times to produce traditional cheeses [11].

The genus *Cynara* L. is native to the Mediterranean flora and belongs to the family Asteraceae; it encompasses eight species and four subspecies, including *Cynara cardunculus* L. (CC) and *Cynara humilis* L. (CH). Some of these *Cynara* species have traditionally been used as milk coagulants in cheesemaking due to their high concentration of proteolytic enzymes responsible for clotting, such as cyprosins or cardosins [12]. These enzymes, present in the characteristic violet flowers that are dried and macerated for use, have proven to be successful substitutes for animal rennet [6]. CC has been used since ancient times for the manufacture of goat and sheep cheeses in several rural areas of Spain and Portugal [13]; some examples are Los Pedroches (Córdoba), Torta del Casar (Cáceres), La Flor de Guía (Gran Canaria), Serra da Estrela (Portugal), and Serpa (Portugal), among others [14].

Various studies have shown that the use of aqueous extracts obtained via the maceration of thistle flowers increases the initial microbial count of the milk and, consequently, of the curd [15,16]. Subsequent studies have shown that freeze drying aqueous extracts does not alter the initial microbial count after addition and have recommended its use as it is soluble in water and milk, is free of viable micro-organisms, has a stable shelf life without the need for preservatives, and has a coagulating activity that does not decrease after one year of storage [7,17–19].

The available studies evaluating the milk clotting activity (MCA) of freeze-dried thistle extracts and their use in cheese production have only been assessed in CC [7,17–22].

The genus *Onopordum* L. belongs to the family Asteraceae, and some of its species are widely distributed in Europe, Northern Africa, the Canary Islands, and the Caucasus, as well as Southwest and Central Asia. Thistles within this genus are native mainly to the Mediterranean biogeographical region and have been studied for their potential as antimicrobial, haemostatic, and hypotensive agents [23,24].

Very few studies describe the use of *Onopordum* spp. in cheese production. Very recently, Mozzon et al. (2020) [25] and Foligni et al. (2022) [26] studied the milk clotting and the caseinolytic activity of a freeze-dried extract from *Onopordum tauricum* Willd. in milk of different origins. To the author's knowledge, no study has evaluated the milk clotting activity (MCA) and proteolytic activity (PA) of the species *Onopordum platylepis* Murb.

Optimal conditions for the milk clotting of aqueous extracts from flowers of *C. cardunculus* L., *C. humilis* L. and *C. scolymus* L. have already been described [27–30], as well as has the proteolytic activity of cardosins A and B on goat casein [31], the proteolytic activity of *C. humilis* L. on ovine Na-caseinate [32] and of *C. scolymus* L. flower extract on bovine casein [33]. Available studies on CH describe the effect of pH and temperature on the rheological properties of gels curdled with CH [34,35].

However, as far as the authors know, no research studies are available on freeze-dried CH and OP performance as agents with clotting and caseinolytic activity.

The main objective of this research work was to characterize the MCA (the effect of extract concentration, temperature, pH, and calcium chloride (CaCl₂) concentration) and PA of freeze-dried extracts obtained from CH and OP compared to those obtained from CC. In order to characterize the freeze-dried extracts, the mineral and the protein content of the extracts obtained from CH and OP were also reported.

2. Materials and Methods

2.1. Freeze-Dried Enzymatic Extract Preparation

CC (from Cáceres, Extremadura, Spain), CH (from Cáceres, Extremadura, Spain), and OP (from Sousse, Tunisia, Africa) were the thistle species used for the preparation of the freeze-dried crude extracts. These were later freeze-dried following the procedure described by Tejada and Fernández-Salguero (2003) [22]. The plant material, styles, and stigmas were macerated in distilled water for 24 h at 25 °C in a 1:10 (*w/v*) ratio. The aqueous extract obtained was sieved, and the filtrate was centrifuged at 3000× *g* for 5 min. The supernatant obtained was filtered with Whatman No. 1 paper. The filtrate obtained was frozen at −32 °C for 24 h and then lyophilised (Alpha 1-2LD plus, Christ, Osterode am Harz, Germany) at a working pressure between 4 and 13 Pa. The lyophilised powder was hermetically packed and frozen at −20 °C until its use.

2.2. Characterisation of Thistle Extracts

2.2.1. Total Protein Content

The total protein of CC, CH, and OP was determined according to the Bradford method [36] using the Sigma (Sigma-Aldrich, Milan, Italy) ready-to-use reagent. A set of bovine serum albumin (Merck, KGa, Darmstadt, Germany) solutions (0.1–1 mg/mL) was used for calibration. Absorbance readings at 595 nm were carried out using a UV-1800 Shimadzu (Kyoto, Japan) spectrophotometer. The protein content of the three enzymatic extracts studied was determined in triplicate.

2.2.2. Mineral Content

Ca, P, Na, K, Mg, Zn and Mn contents of the freeze-dried crude extracts from CH and OP were determined according to the AOAC (2002) [37] method. Briefly, 0.3 g of each sample was ashed. After mineralisation, samples were solubilised in 1 mL of HNO₃ 65% and then adjusted to a final volume of 50 mL of 1% HNO₃ (*v/v*) with 0.1% (*w/v*) CsCl to avoid sodium and potassium ionisation and with 0.1% LaCl₃ (*w/v*) for Ca and Mg detection. Ca, Na, K, Mg, Zn and Mn were detected using Atomic Absorption Spectrometer A. Analyst 300 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA), while phosphorus content was measured at 400 nm using a UV-1800 spectrophotometer (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan). NIST, SMR1570a and SMR1846 (only for Mg) were used as standard reference materials.

2.2.3. Milk Clotting Activity Assay

The milk clotting activity (MCA) of the extracts was assessed using the Berridge test according to the International Dairy Federation (IDF) [38] based on the visual evaluation of the first clotting flakes' appearance. For the clotting activity determination, 10 mL of reconstituted skimmed milk powder (0.12 kg/L) was transferred into a clean and dry test tube. A calcium chloride solution was added at the concentration established in each test (Sigma-Aldrich, Milan, Italy). The assay tube was allowed to equilibrate for 5 min at the desired temperature in an M20 thermostatic water bath (Lauda-Konigshofen, Germany) before adding the enzymatic extract (CC, CH, and OP). After reaching the temperature, 0.1 mL of the enzymatic extracts were added. The time from the addition of the enzyme to the first appearance of solid material was measured in seconds, as clotting. One Soxhlet unit (SU/mL) of clotting activity was defined as the volume of milk that can be clotted by one volume unit of the enzymatic extract in 40 min under defined temperature, pH, and CaCl₂ test conditions [25] and was calculated with the following equation:

$$\text{MCA}(\text{SU}/\text{mL}) = (2400 \times M) \div (T \times V) \quad (1)$$

where M is the volume of milk (mL); T is the clotting time in seconds; and V is the volume of the enzyme (mL).

The effect of four independent variables was studied (extract concentration (5–40 mg/mL), temperature (20–85 °C), pH (5–8), and CaCl₂ concentration (5–70 mM)) on

the milk clotting activity. The clotting activity of the three enzymatic extracts studied was determined in triplicate.

To measure the effect of extract concentration (5, 10, 20, 30 and 40 mg/mL), the conditions of temperature (32 °C), pH (6.2), and CaCl₂ concentration (10 mM) were set.

The effect of temperature (20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, and 85 °C), pH (5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5 and 8) and CaCl₂ concentration (5, 10, 15, 20, 30, 50, 60 and 70 mM) variables were measured at two extract concentrations (20 and 40 mg/mL).

2.2.4. Proteolytic Activity

The proteolytic activity of the enzymatic extracts was determined following the method employed by Silva and Malcata (2005) [39]. The substrate used was bovine milk casein, free of carbohydrates and fatty acids (Calbiochem, Darmstadt, Germany) at 1% (*w/v*) in a 10 mM citrate buffer (pH 6.2) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) with 0.03% (*w/v*) sodium azide (Fisher Scientific, Madrid, Spain) to avoid microbial growth, and was incubated in a bath at 32 °C. Hydrolysis was started by adding 0.12 mL of the reconstituted extract at different concentrations (5, 10, 20, 30 and 40 mg of freeze-dried extract/mL) to 3 mL of the casein solution. Subsequently, 0.5 mL aliquots were sampled at different times (5, 10, 20, 30, 40, 50 and 60 min) and put in Eppendorf tubes. The proteolytic activity was quantified via an evaluation of the peptides soluble in aqueous 5% (*w/v*) trichloroacetic acid (TCA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). For this, 1 mL of 5% TCA (*w/v*) was added to each tube, incubated for 10 min at 25 °C, and centrifuged at 12,000 × *g* for 10 min, while the absorbance of the supernatant was measured at 280 nm in a quartz cuvette. A proteolytic unit (U) was defined as the amount of enzymatic extract that produced a 0.001 unit increase in absorbance at 280 nm per minute under the stated test conditions. All determinations were made in triplicate.

2.3. Statistical Analysis

All experiments were conducted in triplicate, and the results were expressed with the mean and standard error. The statistical analysis of different parameters was computed using the SPSS version 21.0 software package (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). In order to assess differences between the species, a one-way analysis of variance (ANOVA) was applied to mineral composition. Regarding the MCA analysis, a two-way ANOVA was performed to study the influence of temperature, pH, and CaCl₂ concentration. For PA, a two-way ANOVA was applied to analyse the effect of the species and reaction time. Tukey's HSD test ($p < 0.05$) was performed to determine significant differences between the treatment groups. Differences were considered statistically significant when p -values were equal to or below 0.05. Relationships among the studied factors are presented using appropriate curves and tables.

3. Results and Discussion

3.1. Total Protein Content

The protein content of the reconstituted freeze-dried extracts was different ($p < 0.05$) between species CC, CH, and OP, corresponding to 0.1018 ± 0.0065 (mean \pm standard error), 0.1121 ± 0.0102 (mean \pm standard error) and 0.0764 ± 0.0011 (mean \pm standard error) mg protein/mg extract, respectively.

3.2. Mineral Content

In Table 1, the mineral contents of the freeze-dried extracts from CH and OP are shown; in more detail, CH showed a higher content of calcium, potassium, magnesium, and zinc ($p < 0.05$) than OP did, while phosphorous and manganese contents were higher in OP. No differences were seen between these two species for sodium content.

Table 1. Mineral composition (mg/100 g dry weight) of the freeze-dried extracts of *Cynara humilis* L. (CH) and *Onopordum platylepis* Murb. (OP).

Minerals	Species	
	CH	OP
Ca	346.1 ± 2.3 ^a	330.7 ± 4.1 ^b
P	638.9 ± 7.6 ^b	778.1 ± 13.3 ^a
Na	77.3 ± 3.4 ^a	73.6 ± 1.5 ^a
K	7577.7 ± 156.2 ^a	5918.6 ± 86.4 ^b
Mg	393.3 ± 0.4 ^a	311.1 ± 1.4 ^b
Zn	3.2 ± 0.1 ^a	2.5 ± 0.1 ^b
Mn	2.0 ± 0.0 ^b	2.2 ± 0.1 ^a

Data are mean ± standard deviation (n = 3). ^{a,b} different superscript letters in a row mean significant differences (HSD test, $p < 0.05$). CH, *Cynara humilis* L.; OP, *Onopordum platylepis* Murb.

To the authors' knowledge, very scarce data are currently available in the literature about the mineral composition of thistle extracts and, above all, about the mineral composition of CH and OP. A recent study [26] analysed the mineral composition of a freeze-dried extract prepared from *Onopordum tauricum*; the results of this investigation are consistent with those herein reported for OP, especially for P, K, and Zn content.

Some currently available data refer to *C. cardunculus* L. subsp. *scolymus* (L) and *C. cardunculus* L. var. *altilis* (DC) leaves, which have been recognised as a good source of K and Ca; nevertheless, among the micronutrients, mainly Fe and Zn, the mineral composition of thistle leaves is strictly affected by the concentration of nutrient solutions used for the treatment of thistles during their cultivation [40].

In a further investigation, the mineral content of CC flowers and seeds was also reported [41]. These vegetable parts contain considerable amounts of K, Ca, and Mg, while they are poor in Na [42]. According to Hajji Nabih et al. (2021) [43], the main microelements in stems of CC were Na, K, Ca, Mg, B, and P, along with other trace elements (including Zn and Mn).

3.3. Milk Clotting Activity Assay

The milk clotting time measured for each variable studied at the different extract concentrations is given in the Supplementary Materials (Supplementary Tables S1–S4).

3.3.1. Effect of Thistle Species and Extract Concentration

The effect of the concentration (5–40 mg/mL) of CC, CH, and OP extracts on the clotting activity in milk at 32 °C, pH 6.2 and 10 mM CaCl₂ is shown in Figure 1.

The milk clotting activity depends on the concentration of the enzyme. In this study, the MCA value increased with increasing extract concentration ($p < 0.001$); the concentration at which the maximum MCA was reached in all species was 40 mg/mL, and the highest MCA value (409.28 SU/mL) was seen for CC at an extract concentration of 40 mg/mL. The maximum values obtained for CH and OP were 170.64 and 63.16 (SU/mL), respectively.

The correlation between enzyme concentration and clotting time is well-known and has been studied by many authors [30,31,39,44] whose results clearly showed a decrease in clotting time as the concentration of proteases increased and are consistent with our results.

The great MCA performance of the CC species may be due to its high caseinolytic capacity and its content of chymosin-like proteases (Cardosin A and B) acting on κ-casein, more specifically on Phenylalanine₁₀₅–Methionine₁₀₆ bonds [45,46].

To the authors' knowledge, no data are currently available on the performance of *Onopordum platylepis* for MCA performance. Nevertheless, studies evaluating the milk clotting properties of other subspecies of the genus *Onopordum* [25,47] also found maximum MCA values at higher extract concentrations in bovine milk.

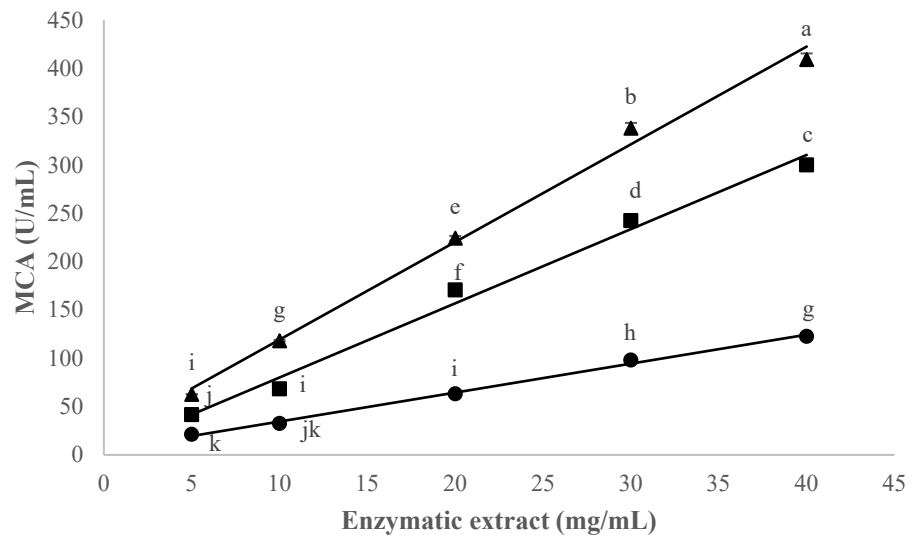


Figure 1. Effect of the enzymatic extract concentration and the species, expressed in mg extract/mL, on the clotting activity (MCA), expressed in SU/mL, of standard bovine skimmed milk at pH 6.2 and 10 mM CaCl₂, using CC, (▲) CH (■) and OP (●). Data are the mean of three independent experiments (*n* = 3). Error bars correspond to standard deviations. Items with different letters (a–k) are significantly different (HSD test, *p* < 0.05).

3.3.2. Effect of Thistle Species and Temperature

The effect of temperature on the clotting activity (*p* < 0.001) of the three extracts of plant origin (CC, CH, and OP) on milk at pH 6.2 and a CaCl₂ concentration of 10 mM was evaluated at temperatures between 20 and 85 °C and different extract concentrations (20 and 40 mg/mL).

The clotting activity of these extracts increased with temperature, with higher coagulation developing at 70 °C in all cases. Furthermore, the milk clotting activity was influenced by the concentration of extract used, as the 20 mg/mL concentration showed lower MCA values than the 40 mg/mL extract concentration did (Figure 2).

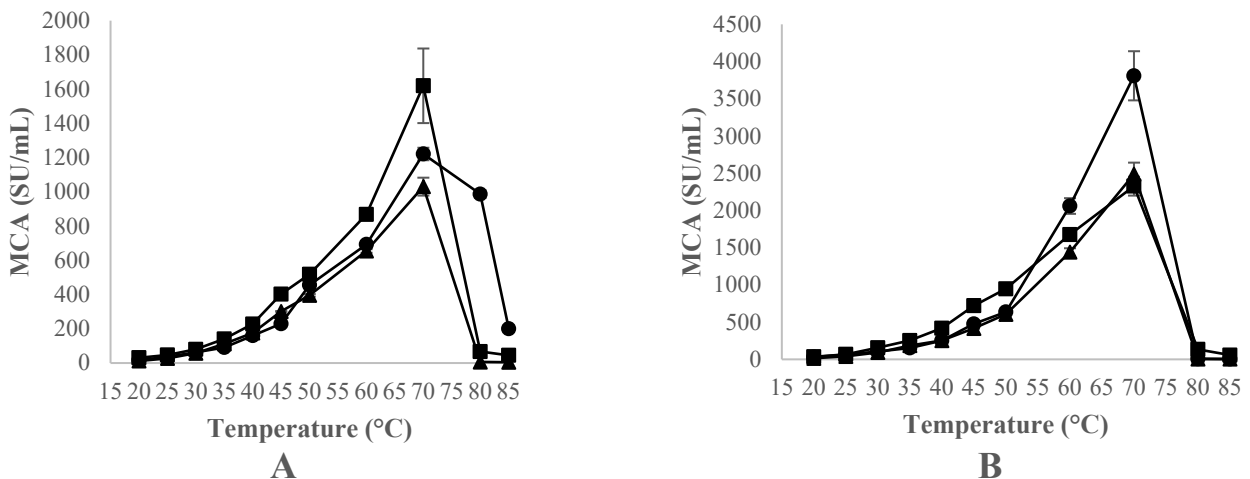


Figure 2. Effect of temperature, expressed in °C, on the clotting activity (MCA), expressed in SU/mL, of standard bovine skimmed milk at pH 6.2 with 10 mM CaCl₂, using CC, (▲) CH (■) and OP (●), at the concentrations of 20 mg extract/mL (A) and 40 mg extract/mL (B). Data are the means of three independent experiments (*n* = 3). Error bars correspond to standard deviations.

Comparing between species, at 70 °C and at an extract concentration of 20 mg/mL, the CH extract showed significantly higher MCA (*p* < 0.05) than the other species herein assayed did. Nevertheless, the clotting capacity of the OP extract concentration was much

more highly favoured by an increase in temperature than that of the other thistle species. Therefore, at the concentration of 20 mg/mL, OP showed a MCA 14.80 and 4.5 times higher than that of CH ($p < 0.05$) at temperatures of 80 and 85 °C, respectively. Moreover, the MCA for OP at 40 mg/mL was 1.23 and 1.64 times higher than that of CH at 60 and 70 °C ($p < 0.05$).

At temperatures above 70 °C, the milk clotting activity of the extracts was found to decrease in all the species herein assayed, indicating the denaturation of the enzymes.

The milk coagulating agents of plant origin assayed in this research consist of clearly thermophilic enzymes whose clotting activity increased with temperature to relatively high values. Several studies [44,48,49] reported that the optimum activity of an aqueous crude extract obtained from CC was between 40 and 60 °C; the same authors reported a decrease in the activity at temperatures over 70 °C, thus agreeing with our results. Furthermore, Ref. [50] confirmed the thermal stability of the aqueous extracts obtained from CH flowers. More recently, Mozzon et al. (2020) [25] investigated the clotting properties of a freeze-dried extract from *O. tauricum* L., observing that its optimum coagulation temperature was 55 °C, the highest in the range tested (35–55 °C), thus leading to the conclusion that temperature positively affects the MCA of the freeze-dried extract.

3.3.3. Effect of Thistle Species and pH

Figure 3 shows the influence of pH on the clotting activity of CC, CH, and OP freeze-dried crude extracts, at concentrations of 20 and 40 mg extract/mL, on milk at 32 °C with 10 mM CaCl₂.

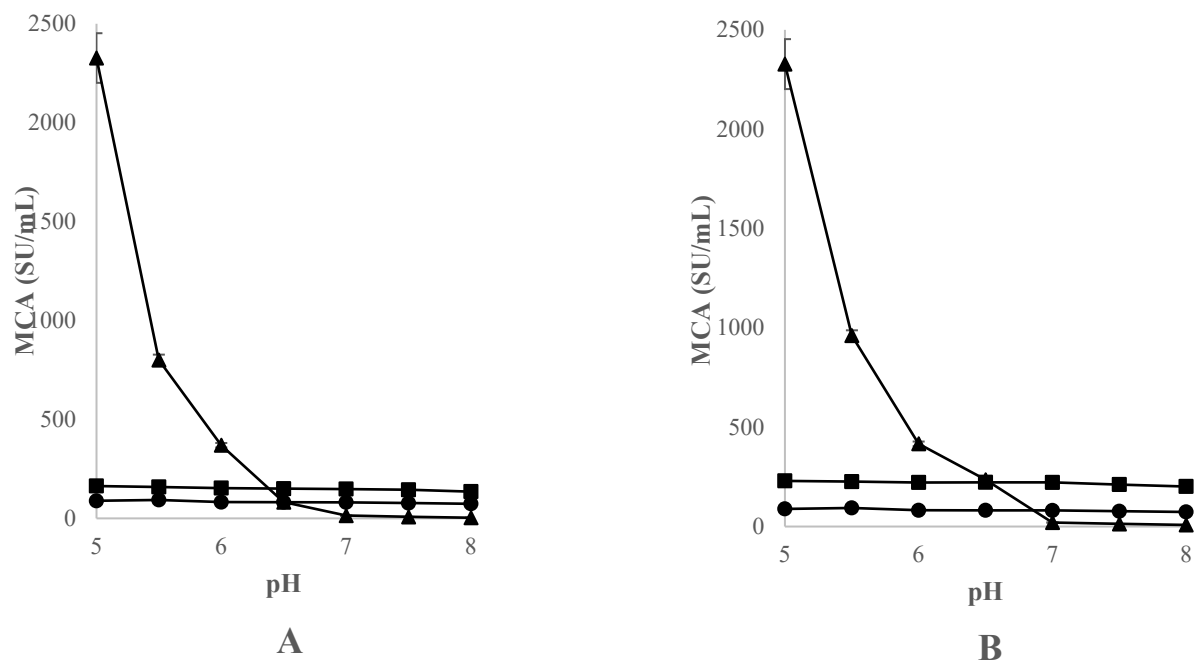


Figure 3. Effect of pH on the clotting activity (MCA), expressed in SU/mL, of standard bovine skimmed milk at 32 °C with 10 mM of CaCl₂, using CC, (▲) CH (■) and OP (●), at the concentrations of 20 mg extract/mL (A) and 40 mg extract/mL (B). Data are mean of three independent experiments ($n = 3$). Error bars correspond to standard deviations.

The clotting activity of these extracts was observed to respond to a wide range of pH values (5.0–8.0), with the maximum MCA value reaching between 5.0 and 5.5. This evidence was expected since the aspartic proteinases from the Cardueae tribe have been shown to have higher milk clotting and caseinolytic activity in acidic pH ranges [39,47]. More specifically, CC and CH presented a maximum MCA at an extract concentration of 40 mg/mL and a pH of 5.0, while OP presented this at a pH of 5.5. As the pH of the milk was increased, the clotting activity of all extracts was observed to decrease drastically at

both extract concentrations studied. The extract concentration used influenced the MCA, which was more significant at higher concentrations.

These results indicate that an increase in pH has a greater negative effect on the MCA of CC than that of CH and OP, and CH is the species whose MCA is the least affected by the increase in pH.

Other studies concluded that aqueous extracts obtained from flowers of *Cynara* species are more active at a slightly acidic pH [51]. Campos et al. (1990) [48] and Heimgartner et al. (1990) [27] previously demonstrated that the proteases, mainly endopeptidases, have a maximum clotting activity at pH values in the range of 5.1–5.7; these data are in accordance with our results. According to Sousa-Gallagher and Malcata (1996) [52] and Chen et al. (2003) [53], the maximum activity of an aqueous crude extract obtained from CC was seen at pH 5.9–6.0. However, Martínez and Esteban (1980) [30] reported that CH shows its highest clotting activity at pH 7.

To date, no data are available on OP; however, for a freeze-dried extract from *Onopordum tauricum*, a higher MCA was recorded at pH values ranging from 4.9 to 5.7 [25,26].

3.3.4. Effect of Thistle Species and CaCl₂

The effect of adding CaCl₂ at different concentrations (5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 and 70 mM) on milk at a temperature of 32 °C and a pH of 6.2 is shown in Figure 4.

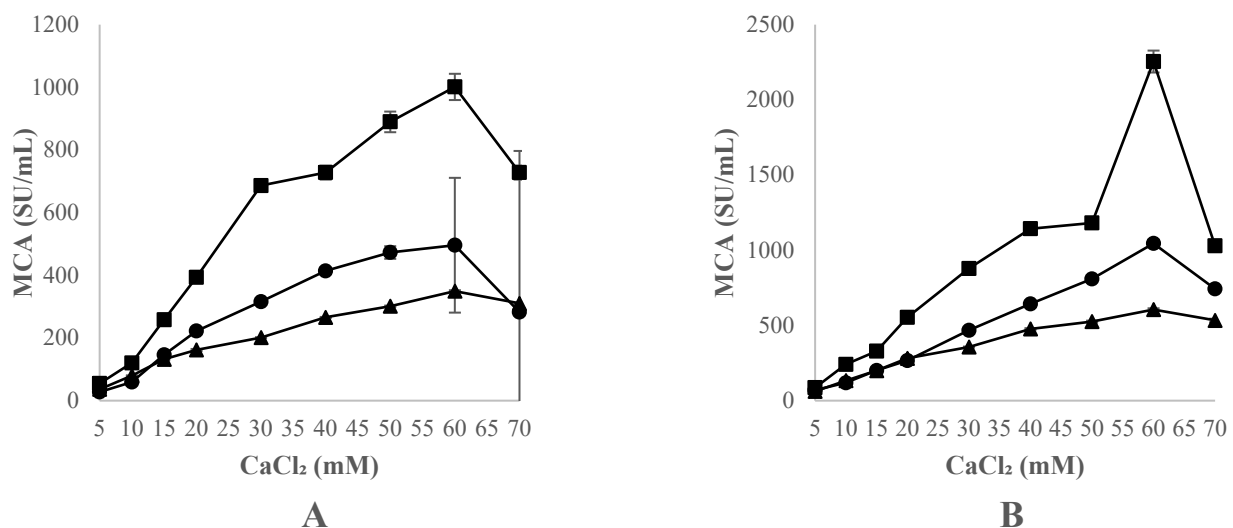


Figure 4. Effect of the concentration of CaCl₂, expressed in mM, on the clotting activity (MCA), expressed in U/mL, of standard bovine skimmed milk at 32 °C and pH 6.2, using CC, (▲) CH (■) and OP (●), at the concentrations of 20 mg extract/mL (A) and 40 mg extract/mL (B). Data are mean of three independent experiments ($n = 3$). Error bars correspond to standard deviations.

For this purpose, three freeze-dried crude extracts (CC, CH, and OP) were assayed at concentrations of 20 and 40 mg/mL. As a general trend, MCA increased at higher CaCl₂ concentrations for all thistle extracts assayed ($p < 0.001$). As far as the extract concentration is concerned, all the assayed species showed higher MCA values at 40 mg/mL than at 20 mg/mL.

All the species presented a maximum MCA value at 60 mM CaCl₂ and at an extract concentration of 40 mg/mL. By comparing the three thistle species, the MCA of CH, at both extract concentrations, was significantly higher than that of CC and OP ($p < 0.05$) at all CaCl₂ concentrations tested. The MCA of OP at 20 mg/mL was higher ($p < 0.05$) than that of CC at CaCl₂ concentrations between 20–60 mM. At a 40 mg/mL extract concentration, the MCA of OP was significantly higher than the MCA of CC except at CaCl₂ concentrations between 30 and 70 mM.

These results indicate that the addition of CaCl_2 significantly improved the clotting activity of these freeze-dried crude extracts. Similar evidence emerges from other studies on aqueous extracts from CC and CH, showing that an increase in CaCl_2 concentration leads to an improvement in clotting activity [30,44,54]. Nevertheless, based on the data herein collected, the MCA of the freeze-dried extract from CC was enhanced the least by an increase in CaCl_2 concentration, compared to that of CH and OP; in contrast, the performance of these latter two species was most positively affected by the addition of high concentrations of CaCl_2 .

In the first phase of the coagulation process, once most of the Phenylalanine₁₀₅–Methionine₁₀₆ bonds have been cleaved, Ca^{2+} ions combine with para-kappa casein fractions to form firm clots. For this reason, the addition of CaCl_2 to milk reduces the coagulation time and allows the aggregation of casein micelles [25,55–57].

3.4. Proteolytic Activity and MCA/PA Ratio

The proteolytic activity (U) in bovine casein (32 °C and pH 6.2) at the reaction times (5, 10, 20, 30, 40, 50 and 60 min) for each of the extract concentrations assayed (5, 10, 20, 30 and 40 mg extract/mL) are shown in Figure 5. For the calculation of the MCA/PA ratio, the MCA values obtained at 32 °C, pH 6.2 and a concentration of 10 mM of CaCl_2 , and the PA values obtained at 60 min were considered (Table 2).

Table 2. Milk clotting activity and proteolytic activity ratio (MCA/PA) of the species at different extract concentrations.

[Extract] (mg/mL)	MCA/PA ¹		
	CC	CH	OP
5	3.2740	2.7359	1.8765
10	3.3861	3.2477	2.5854
20	4.3226	6.0250	3.4263
30	7.3651	7.0204	4.6564
40	7.7977	7.2768	3.5884

¹ MCA expressed in SU/mL; PA expressed in U. [Extract], extract concentration; CC, *Cynara cardunculus* L.; CH, *Cynara humilis* L.; OP, *Onopordum platylepis* Murb.

Comparison data referring to proteolytic activity between the different species, concentrations of extracts, and reaction times are given in the (Supporting Information Supplementary Tables S5 and S6).

The effects of the species on the proteolytic activity were compared at the same extract concentrations previously evaluated for the MCA. As shown in Figure 5, significant differences emerged by comparing species and the reaction time at a specific extract concentration ($p < 0.001$).

The CC and CH species reached a maximum PA value at the 40 mg/mL extract concentration and at 60 min of the reaction, respectively, these values being 52.49 U and 41.24 U. Regarding OP, the highest PA value (34.18 U) was recorded at an extract concentration of 40 mg/mL and at 50 min of hydrolysis.

As previously suggested, the increase in reaction time and extract concentration favourably affects the hydrolysis rate [31,33]. This is consistent with the results herein obtained.

It would be crucial to find the right extract concentration as an excess of proteolytic enzymes can increase secondary proteolysis related to bitter flavours, and an insufficient amount of these enzymes can affect the texture of the cheese by decreasing its consistency [58].

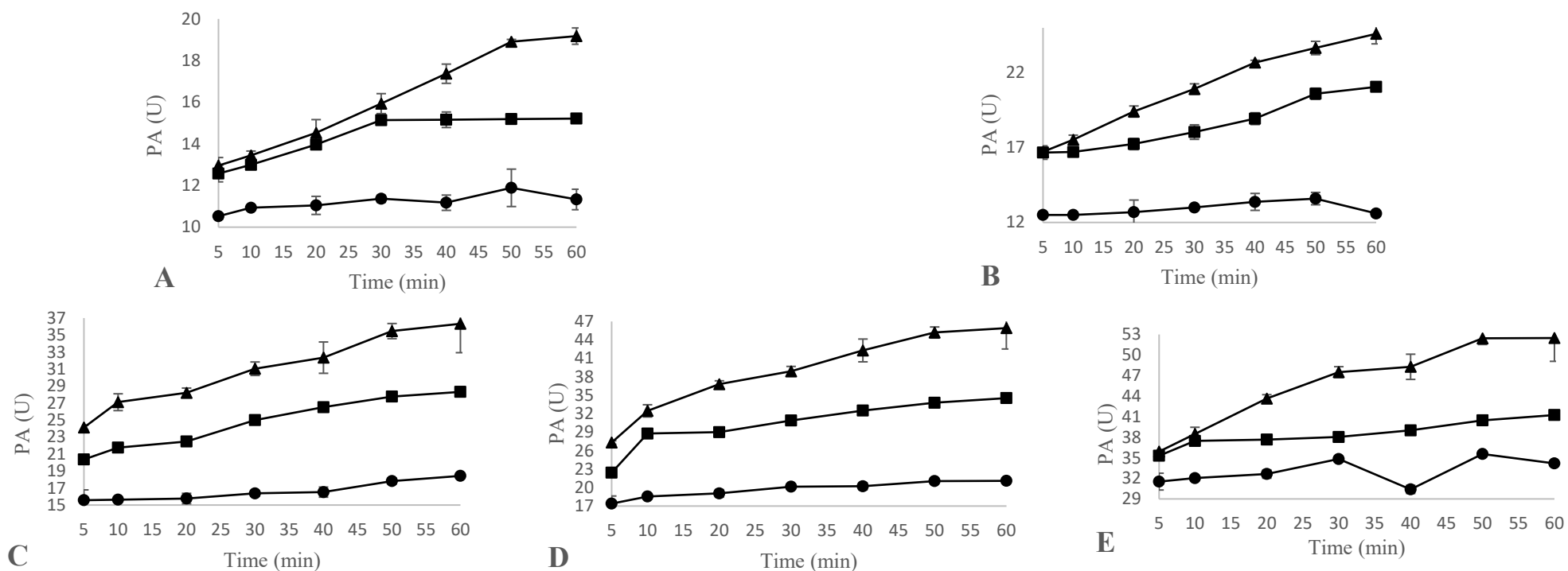


Figure 5. Effect of species CC (▲), CH (■), and OP (●) on the proteolytic activity (PA) of bovine casein at 32 °C and pH 6.2, expressed in U, at the concentrations of 5 mg extract/mL (A), 10 mg extract/mL (B), 20 mg extract/mL (C), 30 mg extract/mL (D) and 40 mg extract/mL (E). Data are the means of three independent experiments (n = 3). Error bars correspond to standard deviations. To the authors' knowledge, no data are currently available on the performance of *Onopordum platylepis* for casein hydrolysis. Its enzymatic composition and the specificity of its component proteases are also unknown; nevertheless, the proteolytic activity of other species belonging to the genus *Onopordum*, such as *Onopordum acanthium* [47] and *Onopordum tauricum* [26], has previously been evaluated, showing a higher specificity for β - and α -caseins and lower specificity for κ -caseins. More specifically, the *Onopordum acanthium* enzymatic extract was shown to have a lower PA than chymosin and the *Cynara cardunculus* extract was.

As far as the increase in hydrolysis rate is concerned, the extract obtained from CC showed the highest rate of hydrolysis at the different extract concentrations assayed, although in some cases, CH and CC extracts showed comparable activities. The slight difference that emerged in the proteolytic activity of CC and CH might be due to the fact that both species have in common the occurrence of an aspartic protease known as cardosin A; however, CC has a second protease called cardosin B, which is even more proteolytic [59].

As a general rule, a balanced degradation of caseins is necessary to develop favourable organoleptic characteristics in cheese. An excess of proteolytic activity during cheesemaking is associated with a low yield and an intense bitter taste due to the accumulation of small low-molecular-weight peptides and hydrophobic peptides responsible for the bitter taste [47,60].

Comparing the values obtained by the different species, the CC and CH species showed a better MCA/PA relation than the OP species did under the conditions tested in this study. Brutti et al. (2012) [47] found higher MCA and PA in the *Cynara cardunculus* extract than in *Onopordum acanthium*; however, the MCA/PA ratio of onopordosin was higher.

The MCA/PA ratio is an important measure related to higher cheese yield and quality. Therefore, the species with the highest MCA/PA ratio is the most suitable for use in cheesemaking. However, it would be advisable to explore the effect of various factors on the MCA/PA ratio, and the optimal conditions of extract concentration, temperature, pH and CaCl₂ at which the performance of the extracts is increased should be taken into account.

4. Conclusions

The performance of the freeze-dried thistle extracts against variations in the factors involved in MCA and PA was as expected. The effect of the parameters (temperature, pH, and CaCl₂ concentration) on the MCA of the extracts was similar at two extract concentrations (20 and 40 mg/mL). The results clearly showed the stability of these extracts at elevated temperatures, showing clotting activity up to a maximum temperature of 70 °C. An increase in pH adversely affects milk coagulation, but an increase in the extract concentration and the addition of CaCl₂ improve this activity. Furthermore, proteolytic activity in bovine casein increased at higher extract concentrations and longer hydrolysis times.

To summarize, the milk clotting conditions to achieve maximum values for CH and OP are [extract] = 40 mg/mL, T = 70 °C, pH 5, and 60 mM CaCl₂, and [extract] = 40 mg/mL, T = 70 °C, pH 5.5, and 60 mM CaCl₂, respectively. The extract from CH showed similar behaviour to that obtained from CC in the hydrolysis of bovine casein, while OP was the species with the lowest caseinolytic capacity.

Given these points, CH and OP proved to be good milk coagulants, at least at the laboratory level, for cheese production. Nevertheless, further research on the use of these thistle-based coagulants in cheesemaking is ongoing to evaluate the changes they generate in proteolysis and the sensory characteristics of final cheeses.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/foods12122325/s1>, Table S1: Milk clotting time (seconds) for milk coagulation of vegetable coagulants from *Cynara cardunculus*, *Cynara humilis* and *Onopordum platylepis* at different extract concentrations; Table S2: Effect of temperature (°C) on the MCT (seconds) of the vegetable coagulants from *Cynara cardunculus*, *Cynara humilis*, and *Onopordum platylepis* at different extract concentrations (mg/mL); Table S3: Effect of the pH on the MCT (seconds) of the vegetable coagulants from *Cynara cardunculus*, *Cynara humilis*, and *Onopordum platylepis* at different extract concentrations (mg/mL); Table S4: Effect of calcium chloride concentration (CaCl₂) on the MCT (seconds) of the vegetable coagulants from *Cynara cardunculus*, *Cynara humilis*, and *Onopordum platylepis* at different extract concentrations (mg/mL); Table S5: Effect of species and reaction times (minutes) on the proteolytic activity (Uabs) of *Cynara cardunculus*, *Cynara humilis*,

and *Onopordum platylepis* plant extracts at different extract concentrations (mg/mL); Table S6: Effect of species and extract concentrations (mg/mL) on the proteolytic activity (Uabs) of *Cynara cardunculus*, *Cynara humilis*, and *Onopordum platylepis* plant extracts at different reaction times (minutes).

Author Contributions: Conceptualization, L.T.; methodology, L.T. and P.M.; formal analysis, C.B.-D.L., L.B.-M. and P.M.; investigation, A.A., C.B.-D.L. and L.B.-M.; resources, A.A., B.A.M.D. and I.E.; visualization, C.B.-D.L.; writing—original draft preparation, C.B.-D.L. and L.B.-M.; writing—review and editing, C.B.-D.L., L.B.-M. and L.T.; supervisión, L.T. and L.A.; project administration, L.A.; funding acquisition, L.T. and L.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work is supported by the Ministry of Economy, Industry and Competitiveness—through the Agencia Estatal de Investigación (AEI-MINECO, PCI2019-103551, España), Italian Ministry of Education, University and Research (MIUR), and Ministry of Higher Education and Scientific Research (MHESR) and is part of the PRIMA programme supported by the European Union, project title “Valorisation of thistle-curdled CHEESEs in MEDiterranean marginal areas” (<https://veggiemedcheeses.com/>).

Data Availability Statement: Data is contained within the article or supplementary material.

Conflicts of Interest: The authors have not stated any conflict of interest.

References

- Mazorra-Manzano, M.A.; Perea-Gutiérrez, T.C.; Lugo-Sánchez, M.E.; Ramirez-Suarez, J.C.; Torres-Llanez, M.J.; González-Córdova, A.F.; Vallejo-Cordoba, B. Comparison of the milk-clotting properties of three plant extracts. *Food Chem.* **2013**, *141*, 1902–1907. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Jacob, M.; Jaros, D.; Rohm, H. Recent advances in milk clotting enzymes. *Int. J. Dairy Technol.* **2011**, *64*, 14–33. [[CrossRef](#)]
- Shah, M.A.; Mir, S.A.; Paray, M.A. Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: A review. *Dairy Sci. Technol.* **2014**, *94*, 5–16. [[CrossRef](#)]
- Galán, E.; Cabezas, L.; Fernández-Salguero, J. Proteolysis, microbiology and sensory properties of ewes’ milk cheese produced with plant coagulant from cardoon *Cynara cardunculus*, calf rennet or a mixture thereof. *Int. Dairy J.* **2012**, *25*, 92–96. [[CrossRef](#)]
- Khalidi, S.; Sonnante, G.; el Gazzah, M. Analysis of molecular genetic diversity of cardoon (*Cynara cardunculus* L.) in Tunisia. *C. R. Biol.* **2012**, *335*, 389–397. [[CrossRef](#)]
- Roseiro, L.B.; Barbosa, M.; Ames, J.M.; Wilbey, R.A. Cheesemaking with vegetable coagulants—The use of *Cynara* L. for the production of ovine milk cheeses. *Int. J. Dairy Technol.* **2003**, *56*, 76–85. [[CrossRef](#)]
- Tejada, L.; Abellán, A.; Prados, F.; Cayuela, J.M. Compositional characteristics of Murcia al Vino goat’s cheese made with calf rennet and plant coagulant. *Int. J. Dairy Technol.* **2008**, *61*, 119–125. [[CrossRef](#)]
- Getu Derso, A.; Gashaw Dagne, G. Isolate and extract for milk clotting enzymes from the leaves of *Moringa oleifera*, *Carica papaya* and *Mangifera indica* and use in cheese making: The case of Western Hararage Region, Ethiopia. *J. Food Nutr. Res.* **2019**, *7*, 244–254. [[CrossRef](#)]
- Beltrán-Espinoza, J.A.; Domínguez-Lujan, B.; Guitierrez-Méndez, N.; Chávez-Garay, D.R.; Nájera-Domínguez, C.; Leal-Ramos, M.Y. The impact of chymosin and plant-derived proteases on the acid-induced gelation of milk. *Int. J. Dairy Technol.* **2021**, *74*, 297–306. [[CrossRef](#)]
- Feijoo-Siota, L.; Villa, T.G. Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications. *Food Bioproc Technol.* **2011**, *4*, 1066–1088. [[CrossRef](#)]
- Gomes, S.; Belo, A.T.; Alvarenga, N.; Dias, J.; Lage, P.; Pinheiro, C.; Pinto-Cruz, C.; Brás, T.; Duarte, M.F.; Martins, A.P.L. Characterization of *Cynara cardunculus* L. flower from Alentejo as a coagulant agent for cheesemaking. *Int. Dairy J.* **2019**, *91*, 178–184. [[CrossRef](#)]
- Sarmento, A.C.; Lopes, H.; Oliveira, C.S.; Vitorino, R.; Samyn, B.; Sergeant, K.; Debyser, G.; Van Beeumen, J.; Domingues, P.; Amado, F.; et al. Multiplicity of aspartic proteinases from *Cynara cardunculus* L. *Planta* **2009**, *230*, 429–439. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Reis, P.M.; Lourenço, P.L.; Domingos, A.; Clemente, A.F.; Pais, M.S.; Malcata, F.X. Applicability of extracts from *Centaurea calcitrapa* in ripening of bovine cheese. *Int. Dairy J.* **2000**, *10*, 775–780. [[CrossRef](#)]
- Silva, S.V.; Barros, R.M.; Malcata, F.X. Hydrolysis of caseins by extracts of *Cynara cardunculus* precipitated by ammonium sulfate. *J. Food Sci.* **2002**, *67*, 1746–1751. [[CrossRef](#)]
- Fernández-Salguero, J.; Sánchez, E.; Gómez, R.; Mata, C.; Vioque, M.; Tejada, L. A preliminary study of microbiological quality of cardoons of genus *Cynara* L. used in manufacture of traditional cheese. *Milchwissenschaft* **1999**, *54*, 688–690.
- Vioque, M.; Gómez, R.; Sánchez, E.; Mata, C.; Tejada, L.; Fernández-Salguero, J. Chemical and microbiological characteristics of ewes’ milk cheese manufactured with extracts from flowers of *Cynara cardunculus* and *Cynara humilis* as coagulants. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 451–456. [[CrossRef](#)]

17. Fernández-Salguero, J.; Tejada, L.; Gómez, R. Use of powdered vegetable coagulant in the manufacture of ewe's milk cheeses. *J. Sci. Food Agric.* **2002**, *82*, 464–468. [[CrossRef](#)]
18. Tejada, L.; Gómez, R.; Fernández-Salguero, J. Sensory characteristics of ewe milk cheese made with three types of coagulant: Calf rennet, powdered vegetable coagulant and crude aqueous extract from *Cynara cardunculus*. *J. Food Qual.* **2007**, *30*, 91–103. [[CrossRef](#)]
19. Tejada, L.; Vioque, M.; Gómez, R.; Fernández-Salguero, J. Effect of lyophilisation, refrigerated storage and frozen storage on the coagulant activity and microbiological quality of *Cynara cardunculus* L. extracts. *J. Sci. Food Agric.* **2008**, *88*, 1301–1306. [[CrossRef](#)]
20. Abellán, A.; Cayuela, J.M.; Pino, A.; Martínez-Cachá, A.; Salazar, E.; Tejada, L. Free amino acid content of goat's milk cheese made with animal rennet and plant coagulant. *J. Sci. Food Agric.* **2012**, *92*, 1657–1664. [[CrossRef](#)]
21. Tejada, L.; Abellán, A.; Cayuela, J.M.; Martínez-Cachá, A.; Fernández-Salguero, J. Proteolysis in goats' milk cheese made with calf rennet and plant coagulant. *Int. Dairy J.* **2008**, *18*, 139–146. [[CrossRef](#)]
22. Tejada, L.; Fernández-Salguero, J. Chemical and microbiological characteristics of ewe milk cheese (Los Pedroches) made with a powdered vegetable coagulant or calf rennet. *Ital. J. Food Sci.* **2003**, *15*, 125–131.
23. Bouazzi, S.; El Mokni, R.; Nakbi, H.; Dhaouadi, H.; Joshi, R.K.; Hammami, S. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils and hexane extract of *Onopordum arenarium* from Tunisia. *J. Chromatogr. Sci.* **2020**, *58*, 287–293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Zenobi, S.; Fiorentini, M.; Aquilanti, L.; Foligni, R.; Mannozi, C.; Mozzon, M.; Zitti, S.; Casavecchia, S.; Al Mohandes Dridi, B.; Orsini, R. Effect of planting density in two thistle species used for vegetable rennet production in marginal Mediterranean areas. *Agronomy* **2021**, *11*, 135. [[CrossRef](#)]
25. Mozzon, M.; Foligni, R.; Mannozi, C.; Zamporlini, F.; Raffaelli, N.; Aquilanti, L. Clotting properties of *Onopordum tauricum* (Willd.) aqueous extract in milk of different species. *Foods* **2020**, *9*, 692. [[CrossRef](#)]
26. Foligni, R.; Mannozi, C.; Gasparrini, M.; Raffaelli, N.; Zamporlini, F.; Tejada, L.; Bande-De León, C.; Orsini, R.; Manzi, P.; Di Costanzo, M.G.; et al. Potentialities of aqueous extract from cultivated *Onopordum tauricum* (Willd.) as milk clotting agent for cheesemaking. *Food Res. Int.* **2022**, *158*, 111592. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Heimgartner, U.; Pietrzak, M.; Geertsen, R.; Brodelius, P.; da Silva Figueiredo, A.C.; Pais, M.S.S. Purification and partial characterization of milk clotting proteases from flowers of *Cynara cardunculus*. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 1405–1410. [[CrossRef](#)]
28. Llorente, B.E.; Brutti, C.B.; Caffini, N.O. Purification and characterization of a milk-clotting aspartic proteinase from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 8182–8189. [[CrossRef](#)]
29. Llorente, B.E.; Obregón, W.D.; Avilés, F.X.; Caffini, N.O.; Vairo-Cavalli, S. 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 Chem.* **2014**, *159*, 55–63. [[CrossRef](#)]
30. Martínez, E.; Esteban, M.A. Clotting activity of an extract from the flowers of the cardon *Cynara humilis*. *Arch. Zootec.* **1980**, *29*, 107–116.
31. Silva, S.V.; Malcata, F.X. Influence of the coagulant level on early proteolysis in ovine cheese-like systems made with sterilized milk and *Cynara cardunculus*. *J. Food Sci.* **2004**, *69*, C579–C584. [[CrossRef](#)]
32. Serrano, E.; Marcos, A. Proteolytic activity of the extract from the flowers of *Cynara humilis* L. *Arch. Zootec.* **1980**, *29*, 11.
33. Bueno-Gavilá, E.; Abellán, A.; Bermejo, M.S.; Salazar, E.; Cayuela, J.M.; Prieto-merino, D.; Tejada, L. Characterization of proteolytic activity of artichoke (*Cynara scolymus* L.) flower extracts on bovine casein to obtain bioactive peptides. *Animals* **2020**, *10*, 914. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Esteves, C.L.C.; Lucey, J.A.; Hyslop, D.B.; Pires, E.M.V. Effect of gelation temperature on the properties of skim milk gels made from plant coagulants and chymosin. *Int. Dairy J.* **2003**, *13*, 877–885. [[CrossRef](#)]
35. Esteves, C.L.C.; Lucey, J.A.; Wang, T.; Pires, E.M.V. Effect of pH on the gelation properties of skim milk gels made from plant coagulants and chymosin. *J. Dairy Sci.* **2003**, *86*, 2558–2567. [[CrossRef](#)]
36. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. AOAC. AOAC Official Method 991.25. Calcium, Magnesium, and Phosphorus in Cheese, Atomic Absorption Spectrophotometric and Colorimetric Method. In *Official Methods of Analysis*, 17th ed.; AOAC International: Arlington, VA, USA, 2002.
38. *IDF Standard 110A*; Determination of the Clotting Time of Milk to Which a Milk Clotting Enzyme Solution has Been Added. International Dairy Federation: Brussels, Belgium, 1987.
39. Silva, S.V.; Malcata, F.X. Studies pertaining to coagulant and proteolytic activities of plant proteases from *Cynara cardunculus*. *Food Chem.* **2005**, *89*, 19–26. [[CrossRef](#)]
40. Roupheal, Y.; Cardarelli, M.; Lucini, L.; Rea, E.; Colla, G. Nutrient solution concentration affects growth, mineral composition, phenolic acids, and flavonoids in leaves of artichoke and cardoon. *HortScience* **2012**, *47*, 1424–1429. [[CrossRef](#)]
41. Petropoulos, S.; Fernandes, Â.; Pereira, C.; Tzortzakos, N.; Vaz, J.; Soković, M.; Barros, L.; Ferreira, I.C.F.R. Bioactivities, chemical composition and nutritional value of *Cynara cardunculus* L. seeds. *Food Chem.* **2019**, *289*, 404–412. [[CrossRef](#)]
42. Silva, L.R.; Jacinto, T.A.; Coutinho, P. Bioactive Compounds from Cardoon as Health Promoters in Metabolic Disorders. *Foods* **2022**, *11*, 336. [[CrossRef](#)]
43. Hajji Nabih, M.; El Hajam, M.; Boulika, H.; Hassan, M.M.; Idrissi Kandri, N.; Hedfi, A.; Zerouale, A.; Boufahja, F. Physicochemical Characterization of Cardoon "*Cynara cardunculus*" Wastes (Leaves and Stems): A Comparative Study. *Sustainability* **2021**, *13*, 13905. [[CrossRef](#)]

44. Vieira de Sá, F.; Barbosa, M. Cheese-making with a vegetable rennet from cardo (*Cynara cardunculus*). *J. Dairy Res.* **1972**, *39*, 335–343. [[CrossRef](#)]
45. Galán, E.; Prados, F.; Pino, A.; Tejada, L.; Fernández-Salguero, J. Influence of different amounts of vegetable coagulant from cardoon *Cynara cardunculus* and calf rennet on the proteolysis and sensory characteristics of cheeses made with sheep milk. *Int. Dairy J.* **2008**, *18*, 93–98. [[CrossRef](#)]
46. Chazarra, S.; Sidrach, L.; López-Molina, D.; Rodríguez-López, J.N. Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus*, L.) flowers. *Int. Dairy J.* **2007**, *17*, 1393–1400. [[CrossRef](#)]
47. Brutti, C.B.; Pardo, M.F.; Caffini, N.O.; Natalucci, C.L. *Onopordum acanthium* L. (Asteraceae) flowers as coagulating agent for cheesemaking. *LWT-Food Sci. Technol.* **2012**, *45*, 172–179. [[CrossRef](#)]
48. Campos, R.; Guerra, R.; Aguilar, M.; Ventura, O.; Camacho, L. Chemical characterization of proteases extracted from wild thistle (*Cynara cardunculus*). *Food Chem.* **1990**, *35*, 89–97. [[CrossRef](#)]
49. Christen, C.; Virasoro, E. Présures végétales. Extraction et propriétés. *Le Lait* **1935**, *15*, 354–363. [[CrossRef](#)]
50. Marcos, A.; Esteban, M.A.; Martínez, E.; Alcalá, M.; Fernández-Salguero, J. Thermal inactivation of proteinases from the flowers of the cardoon *Cynara humilis* L.: Kinetic and thermodynamic parameters. *Arch. Zootec.* **1980**, *29*, 283–294.
51. Claverie-Martín, F.; Vega-Hernández, M.C. Aspartic proteases used in cheese making. In *Industrial Enzymes*; Polaina, J., MacCabe, A.P., Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2007; pp. 207–219. [[CrossRef](#)]
52. Sousa-Gallagher, M.J.; Malcata, F. Effects of processing conditions on the caseinolytic activity of crude extracts of *Cynara cardunculus* L. *Food Sci. Technol. Int.* **1996**, *2*, 255–263. [[CrossRef](#)]
53. Chen, S.J.; Zhao, J.; Agboola, S. Isolation and partial characterization of rennet-like proteases from Australian cardoon (*Cynara cardunculus* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3127–3134. [[CrossRef](#)]
54. Zikiou, A.; Zidoune, M.N. Enzymatic extract from flowers of Algerian spontaneous *Cynara cardunculus*: Milk-clotting properties and use in the manufacture of a Camembert-type cheese. *Int. J. Dairy Technol.* **2019**, *72*, 89–99. [[CrossRef](#)]
55. Bencini, R. Factors affecting the clotting properties of sheep milk. *J. Sci. Food Agric.* **2002**, *82*, 705–719. [[CrossRef](#)]
56. Lagaude, A.; Fernandez, L.; Cuq, J.L.; Marchesseau, S. Characterization of curd formation during the rennet coagulation of milk by an optical microscopic method. *Int. Dairy J.* **2004**, *14*, 1033–1039. [[CrossRef](#)]
57. Nájera, A.I.; de Renobales, M.; Barron, L.J.R. Effects of pH, temperature, CaCl₂ and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk: A multifactorial study. *Food Chem.* **2003**, *80*, 345–352. [[CrossRef](#)]
58. Liu, X.; Wu, Y.; Guan, R.; Jia, G.; Ma, Y.; Zhang, Y. Advances in Research on Calf Rennet Substitutes and Their Effects on Cheese Quality. *Food Res. Int.* **2021**, *149*, 110704. [[CrossRef](#)]
59. Esteves, C.L.C.; Lucey, J.A.; Pires, E.M.V. Rheological properties of milk gels made with coagulants of plant origin and chymosin. *Int. Dairy J.* **2002**, *12*, 427–434. [[CrossRef](#)]
60. Pires, E.; Faro, C.; Macedo, I.; Esteves, C.; Morgado, J.; Veríssimo, P.; Pereira, C.; Gomes, D. Flor do cardo versus quimosina no fabrico de queijos artesanais. *Bol. Soc. Port. Química* **1994**, *54*, 66–68. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

5.1.3. Optimization of milk-clotting activity and rheological properties characterization of *Onopordum platylepis* Murb. in ewe's milk.

Optimization of milk-clotting and rheological properties characterization of *Onopordum platylepis* Murb. in ewe's milk.

C. Bande-De León^{a,*}, D. Delgado^b, D. Fernández^c, M. Mozzon^d, A. Abellán^a, L. Aquilanti^d and L. Tejada^a

^a Department of Human Nutrition and Food Technology, Universidad Católica de Murcia-UCAM, Campus de los Jerónimos, 30107 Murcia, Spain

^b Estación tecnológica de la Leche, ITACYL, Junta de Castilla y León, 34071 Palencia, Spain

^c Department of Food Hygiene and Technology, León University, 24071 León, Spain

^d Departament of Agricultural, Food and Environmental Sciences, Università Politecnica delle Marche, Via Brecce Bianche, 60131 Ancona, Italy

*Corresponding author: Cindy Bande-De León; Email: cmbande@ucam.edu; Tel.: +34 653264731

ABSTRACT

In recent years, the search for new plant species for use as milk coagulating agents in cheese production has increased. The coagulation kinetics and technological properties of *Onopordum platylepis* Murb. (OP) were evaluated for the first time in ewe's milk. Optimal conditions (T = 36°C, pH 5.5, y [CaCl₂] = 6 mM) were established to maximize coagulant activity in ewe's milk using response surface methodology to determine the effects of interactions of the variables of temperature (30, 33 y 36 °C), pH (5.5, 6.0, y 6.5), and calcium chloride concentration (2, 4, y 6 mM) and compared with the thistle species *Cynara cardunculus* L. (CC) and *Cynara humilis* L. (CH). For all coagulants, an increase in temperature and calcium chloride concentration and a decrease in pH, resulted in a decrease in milk coagulation time. The rheological properties of OP gels produced at a temperature of 32 °C and a pH of 6.5 were compared with

CC, CH, animal rennet (AR), a commercial vegetable coagulant (CV), and a fermented chymosin coagulant (FC). Analysis were performed at the same dose (50 IMCU/L of milk) for a same rennet coagulation time (RCT) and coagulation kinetic curve were divided in 3 time intervals: start of aggregation (t_0), increasing aggregation rate interval (t_i), and decreasing aggregation rate Interval (t_{ii}). In the curd firming rate (CFR) analysis, the velocity of OP was similar to that of CH and lower than that of CC, AR and FC. The firmness of the gels produced by OP was similar to that of CV and lower than that of AR and FC. The water holding capacity (WHC) of OP was similar to the other coagulants, while the losses of protein and nitrogenous components were higher for OP, CH and CC than for AR and FC.

Key Words: milk clotting activity, *Onopordum platylepis*, vegetable coagulant, coagulation kinetics, sheep milk.

1. INTRODUCTION

The search for new coagulants for cheese production has increased due to the low availability of animal rennet caused mainly by the growing demand for cheese and the consequent increment in its production, as well as the increase in the price of animal rennet. Added to this is the need to satisfy the needs of a growing segment of the market, such as Kosher, Halal, lacto-vegetarian and against genetically modified products consumers (Nicosia et al., 2022; Alavi and Momen, 2020; Jacob et al., 2011). In this respect, coagulants from plant proteases are one of the main coagulants used as substitutes for animal rennet and one of the most studied in recent years (Rampanti et al., 2023). In particular, aqueous extracts of proteases of the Asteraceae family from the wildflowers of thistles, mainly *Cynara* species, have been used since ancient times in the

production of cheeses, including Protected Designation of Origin cheeses made from raw ewes' milk produced in Portugal (Serra da Estrela and Serpa cheeses) and Spain (Torta del Casar, La Serena and Los Pedroches cheeses) (Ordiales et al., 2016; Fernández-Salguero & Sanjuán, 1999).

To the authors' knowledge, available studies mainly focus on the genus *Cynara* L. (Roseiro et al., 2003; Chazarra et al., 2007; Vioque et al., 2000), and very few studies, most of them recently published, evaluate the technological and chemical properties of other thistle species that can be used in cheese production (Mozzon et al., 2020; Foligni et al., 2022; Rampanti et al., 2023). In this context, some species of the genus *Onopordum* L. have been studied as potential milk-clotting enzyme extracts; however, the literature on this purpose is still scarce (Tamer, I.M., 1993; Brutti et al., 2012). In our previous study on freeze-dried plant extracts, we investigated the potential of a novel thistle species, *Onopordum platylepis* Murb., for milk coagulation and its caseinolytic capacity and performed a detailed characterization of its milk clotting activity (Bande-De León et al., 2023). However, no studies evaluate the gelation properties of the species *Onopordum platylepis* Murb.

In the study of the technological properties of the coagulant, determining the optimum working conditions in the coagulant activity is crucial in order to maximize its performance in cheese production. During cheesemaking, several factors simultaneously intervene; for this reason, the response surface methodology (**RSM**) is used to analyse several factors' influence on a particular response by combining mathematical and statistical techniques. With the conventional method, only the variation of one of the factors can be explored

while keeping the rest of the intervening variables constant (Ben Amira et al., 2017a; Mozzon et al., 2020).

However, a crucial step in cheesemaking is the gelation of the milk; therefore, it is important to evaluate the physical evolution of the gel during the milk curdling (Esteves et al., 2003a; Ben Amira et al., 2017a). The study of milk coagulation kinetics can be used to improve cheese yield and, at the same time, increase the quality of the final product (Muñoz et al., 2023). Studies have been carried out on the rheological properties of milk gels obtained with *Cynara cardunculus* L. and *Cynara humilis* L. (Esteves et al., 2002, 2003a, 2003b), although these properties have not been investigated in gels produced with *Onopordum platylepis* Murb.

This work aims to establish the optimal conditions of temperature (**T**), pH, and calcium chloride concentration (**[CaCl₂]**) for the coagulation of sheep's milk with an extract obtained from wild *Onopordum platylepis* Murb., enabling the production of new lacto-vegetarian versions of cheeses. In the same way, the coagulation kinetics and rheological characteristics of the obtained gels will be evaluated and compared with other coagulants.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Material

2.1.1 Freeze-dried Extracts Preparation

Plant material from *Cynara cardunculus* L. (**CC**), *Cynara humilis* L. (**CH**), and *Onopordum platylepis* Murb. (**OP**) was obtained from spontaneously grown flowers. CC and CH flowers were collected from Cáceres, Spain, and the OP flowers from Sousse, Tunisia.

Flower styles and stigmas were used to prepare the freeze-dried extracts obtained as described by Tejada & Fernández-Salguero (2003). After freeze-drying (Alpha 1-2LD plus, Christ, Osterode am Harz, Germany), the powdered extract was frozen at -20°C for storage until use.

2.1.2 Preparation and Chemical Characterization of Milk Substrate:

Raw milk from Churra sheep was collected from a local farm (Palencia, Spain), to which azidiol (3 mL/L^{-1}) was added to prevent microbial growth. It was kept refrigerated (4°C) until its use in the coagulation kinetics tests to maintain its physicochemical properties intact.

For the study of the milk clotting activity (**MCA**), the milk was skimmed by centrifugation ($5000g$ and 4°C for 20 min) for better visualization of the beginning of flocculation and freeze-dried (at a working pressure between 4 and 13 Pa) and frozen (-20°C) for conservation purposes.

Raw milk was analyzed for fat, protein, lactose, total solids, and urea content in a MilkoScan FT+ (FOSS, Hilleroed, Denmark). Data are shown in Table 1.

2.2 Milk Clotting Activity Assay by Response Surface Methodology:

Using RSM, three variables affecting milk clotting were studied and optimized by conducting the statistically designed experiments, estimating the coefficients of the structured mathematical model, and checking the prediction of the responses and the adequacy of the model.

As shown in Table 3, the design matrix consists of twelve experiments to study the simultaneous effects of three-level discrete variables, T (30, 33 and 36 °C), pH (5.5, 6.0 and 6.5), and [CaCl₂] (2, 4 and 6 mM).

Likewise, the order of the experiments was completely randomized. Each experiment was carried out in double, and the results were compared with the predicted responses to confirm the validity of the RSM model. The D-optimal criterion was used to minimize the determinant of the variance matrix of the regression parameters.

The total milk clotting activity was performed according to the method described by Foligni et al. (2022) with slight modifications. The freeze-dried skimmed milk powder was reconstituted according to its dry extract content (17.59% w/w) in calcium chloride solutions prepared at the different concentrations and pH of the study. A volume of 10 mL of the different reconstituted milk solutions was transferred into a test tube and kept in a thermostatic bath until the milk reached the desired T. After the T was reached, the vegetable coagulants and animal rennet were added, and the milk clotting time (**MCT**) was measured in seconds from the addition of the milk coagulant to the first visualization of clots on the walls of the test tube. The MCA of the freeze-dried plant extracts were compared with a commercial liquid Lamb rennet (75 RU) provided by Cuajos Caporal (Valladolid, Spain). The freeze-dried vegetable extracts (CC, CH, OP) were reconstituted in distilled water at a concentration of 20 mg/mL, and 1 mL was added. In the case of animal rennet (**AR**), following the manufacturer's instructions, 2.5 µL of rennet was added.

2.3 Rheological Assay

2.3.1 Milk Coagulation Kinetics Assay:

Firstly, 200 grams of milk were weighed and heated to the test T (32°C) in a thermostatic bath. Once the T was reached, 2.3 mM calcium chloride was added, and after homogenization, the milk coagulants were added. Next, the coagulation kinetics of the freeze-dried extract of OP was compared with freeze-dried plant extracts of CH and CC; and with three commercial coagulants: 100% chymosin produced by fermentation (**FC**) (Chymax M 200 IMCU/mL, Chr Hansen, Denmark), animal rennet (AR) (75 RU, Cuajos Caporal, Spain) and a liquid vegetable coagulant from *Cynara cardunculus* (**CV**) (1:15000, Laboratorios Arroyo, Spain). The coagulants were compared at the same dose (50 IMCU/L of milk), taking as a reference the strength of the commercial coagulant FC. For which the amount of each of the coagulants was calculated experimentally (Table 2) to obtain the same rennet clotting time (**RCT**) as for the coagulant taken as control (Esteves et al., 2002) Taking the commercial activity of the coagulant FC as a reference, the MCA (IMCU/g of coagulant) of each coagulant tested was calculated, working at pH 6.5 according to international standards (ISO/IDF, 2007). After the addition of the different enzymatic coagulants under study at the reference dose (50 IMCU/L) and pH 6.5, a light agitation was carried out for 30 seconds to ensure complete mixing. Subsequently, 18 mL were taken and introduced into the cup/cylinder system (CC27/T200/AL, Anton Paar, Austria) of the rheometer (Physica MCR 301, Anton Paar, Austria) at a controlled T of 32 °C to carry out the milk clotting test. A constant oscillation was applied to the sample at a 0.5% strain rate and a frequency of 1 Hz (Muñoz et al., 2023). The elastic modulus (G') and viscous modulus (G'') were monitored for 30 min, working in the viscoelastic region of the gels. The analysis of the firmness curve (G' vs time)

and its first and second derivative was performed to obtain the coagulation parameters, following the method of Frederiksen et al. (2011), using the Rheometer software (Rheoplus 3.62, Anton Paar, Austria). The coagulation curve parameters analyzed (Figure 1) were:

- RCT, the time at which the first flocs are reached, is calculated as the cut-off point between the G' and G'' curves.
- CFR, calculated as the slope of the curve G' vs t at the maximum of the first derivative (1D). The time (**MAX_{1D}**) and firmness (**G'_{CFR}**) coordinates were calculated at this point.
- Firmness of the gel at the end of the test (**G'_F**).
- Locating the maximum and minimum of the second derivative, the zone of maximum variation of CFR is delimited (Arango et al., 2015). To better understand the changes experienced, this zone was divided into three time intervals: 0) Start of aggregation after hydrolysis (**t₀**); I) interval of increasing aggregation rate (**t_I**) or primary aggregation zone; II) interval of decreasing aggregation rate (**t_{II}**) or secondary aggregation zone.

$$t_0 = \text{MAX}_{2D} - \text{RCT}$$

$$t_I = \text{MAX}_{1D} - \text{MAX}_{2D}$$

$$t_{II} = \text{MIN}_{2D} - \text{MAX}_{1D}$$

These intervals were calculated from RCT and the times at which the maximum of the first derivative (MAX_{1D}) and the maximum (**MAX_{2D}**) and

minimum (**MIN_{2D}**) of the second derivative (2D) of the G' vs t curve were reached.

2.3.2 Analysis of Water Holding Capacity (WHC) and Whey Composition:

In order to carry out these analyses, the method described by Muñoz et al. (2023) was followed. Aliquots of 50mL were taken after the addition of the different coagulants and kept at a T of 32°C in a thermostatic bath until gels were formed with a firmness of 170 Pa, which ensured that the maximum velocity point (G'_{CFR}) had been reached. The aliquots were kept for 24 hours under refrigerated conditions (4°C), after which the curd was weighed, centrifuged at 4000x g for 10 min at 5°C, and the resulting supernatant was subsequently weighed. The following formula was used for the calculation (Vianna et al., 2017):

$$\text{WHC (\%)} = 100 \frac{(Y - DW)}{Y}$$

where Y is the total curd weight; and DW is the supernatant weight.

The supernatant obtained from the centrifugation was analyzed for fat, total protein, and urea content using a CombiFoss7 instrument (FOSS, Hilleroed, Denmark).

2.4 Statistical Analysis

JMP Software Version 17.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) was used to investigate three different parameters (T, pH, and [CaCl₂]) affecting the total milk clotting activity. In order to conduct the experimental design and statistical analysis, the RSM was used.

A second-order polynomial equation was chosen to select the optimal levels of three variables using the standard least squares regression methodology to estimate the parameters of the mathematical model. The quality of fit of the polynomial model equation was expressed by a coefficient of determination, R^2 . Analysis of variance (ANOVA) was performed to assess the statistical significance of the model.

In this study, twelve experiments were designed and carried out with 3 level discrete variables of T, pH, and $[CaCl_2]$. The RSM model was validated further by comparing the predicted versus experimental responses.

Rheological data were statistically analyzed by one-factor analysis of variance (ANOVA) to determine significant differences ($p < 0.05$) between the different coagulants (SPSS 9.0, IBM Spain, Spain). Four coagulation trials were performed with each of the coagulants. When differences were significant, Tukey's test was used for post hoc multiple comparisons. Principal component analysis was performed using statistical software for multivariate analysis (XLSTAT Pro 2007, Addinsoft, France).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Milk Clotting Activity (MCA) Assay by Response Surface Methodology (RSM)

Table 3 shows the experimental design and the results obtained for the three-level-three-factor response surface analysis. The results of the ANOVA and Fisher's F-test of the second-order model coefficients are summarised in Table 4. The linear factors of T and $[CaCl_2]$ significantly influenced ($p < 0.05$) the MCT

of all coagulant types. Furthermore, the linear pH factor significantly affected the MCT of AR and OP.

The quadratic effect of the variable T had a significant impact ($p < 0.05$) on the MCT of AR, CC and CH. The MCT of AR was significantly affected by the quadratic effect of $[\text{CaCl}_2]$. However, the pH quadratic effect did not significantly affect the MCT of any of the coagulants. The interaction between pH and $[\text{CaCl}_2]$ significantly affected the MCT of AR and OP. Only the MCT of OP was significantly affected by the interaction effect between the variables T and $[\text{CaCl}_2]$. On the other hand, the MCT was not significantly affected by the interactive effect of the T and pH variables (Table 4).

Similarly, Bande-De León et al. (2023) found that the OP extract enhanced its MCA the most by increasing temperature and CaCl_2 concentration in bovine milk compared to the CC and CH extracts.

The polynomial model describing the correlation between the three variables and milk clotting activity for AR, CC, CH, and OP is presented in Table 5. The ANOVA results of the model equations suggest that the model was highly significant ($p < 0.0001$) in all cases attesting to a good model fit. The coefficient of determination (R^2) parameter is a measure of the quality of fit that guarantees the model's performance. Similarly, the adjusted R^2 indicate the contribution of factors (T, pH, and $[\text{CaCl}_2]$) that significantly affect the MCT. A good fit is considered when R^2 approach unity.

To minimize the MCT, the optimal conditions of T, pH and $[\text{CaCl}_2]$ for each coagulant are specified in Table 6. The presented results demonstrate the

accuracy and reliability of the models developed since the results obtained in the MCA test are consistent with the results predicted by the response equations.

Figures 2-4 show the response Surface 3D plots for the linear, quadratic effect and interactions among factors affecting the MCT of the four coagulants studied. It is shown that the MCT of AR, CC, CH and OP is sensitive to the linear effect of T variation (figures 2 and 3); more specifically, the increase of T decreases the MCT of all tested coagulants. While only the MCT of AR and OP is influenced by the linear effect of $[CaCl_2]$ with a decrease in MCT after increasing the $[CaCl_2]$. It is observed that at low pH levels, the MCT decreases; nevertheless, no significant effect of pH on the MCT of the coagulants is evident (figures 2 and 4).

The conditions under which the lowest MCT was achieved were the same for all coagulants, being $T = 36^\circ C$, $pH 5.5$, y $[CaCl_2] = 6 \text{ mM}$. The optimal levels of the factors T and $[CaCl_2]$ were the highest within the ranges evaluated ($30\text{-}36^\circ C$) and ($2\text{-}6 \text{ mM}$), respectively. However, in the case of pH, the optimal level was the lowest within the range explored ($5.5\text{-}6.5$). These coagulants' technological parameters (T, pH, and $[CaCl_2]$) could be useful for ewe's milk clotting on an industrial scale.

These results are consistent with those found in previous research (Bande-De León et al., 2023; Foligni et al., 2022; Slamani et al., 2018) showing that in the optimum values for improving the MCA, both in plant enzymes and those from animal rennet, the pH coincides with the lowest value of the ranges explored and the value of the $[CaCl_2]$ is the highest of the ranges explored. In the case of T, for plant-derived proteases, the optimum T value coincides with the highest value studied due to their thermophilic nature (Christen and Virasoro, 1935; Marcos et

al., 1980). However, for animal rennet-derived enzymes, the optimum values of T are between 40-45 °C because higher values (50-65 °C) can lead to enzymatic thermal denaturation (Martinez & Esteban, 1980).

The effect of T and pH during the milk coagulation process has been studied many times with different types of milk and coagulants, and it has been concluded that both factors influence the enzymatic hydrolysis and aggregation reactions (Castillo et al., 2000; Esteves et al., 2003a, 2003b). Both animal rennet proteases and proteases from thistle flowers have been shown to have an acidic character, which also explains the increase in their activity when approaching acidic conditions (Anema et al., 2007; Ben Amira et al., 2017b).

The variation of CaCl₂ affects the MCA since an increase in its concentration promotes the aggregation of caseins by acting on the conformation of the substrate and as an enzymatic catalyst. Furthermore, this effect is enhanced by decreased pH due to the exchange of Ca²⁺ and H⁺ during the process (Nájera et al., 2003; Zikiou & Zidoune, 2019; Ahmed et al., 2010).

Comparing vegetable coagulants under optimal conditions, CC was the extract with the best performance in milk clotting, and CH showed similar activity to CC. On the other hand, OP obtained the highest MCT, resulting in lower clotting activity. These results are consistent with previous research in which, under conditions similar to those herein tested, the MCA of OP was lower than CC and CH; however, under certain conditions, OP showed higher performance and demonstrated a proteolytic activity comparable to CC and CH (Bande-De León et al., 2023).

3.2 Coagulation Kinetics and Rheological Properties of Gels

Table 7 shows the results of coagulation kinetics in sheep milk using the different milk coagulants under study.

The commercial coagulants (AR, FC and CV) presented a higher MCA than those obtained from lyophilized extracts from thistle flowers (CC, CH and OP). More specifically, OP showed a 95% lower MCA than the chymosin used as reference (FC), while CH and CC activity was respectively 50% and 29% lower than the MCA of FC. Regarding commercial coagulants, no significant differences ($p > 0.05$) were found between AR and FC, while CV activity was 12% lower than FC ($p < 0.05$). Due to the adjustment of the coagulant dosage (Table 2) to 50 IMCU/L of milk, no significant differences ($p > 0.05$) were observed for the coagulation times (RCT) between the different coagulants used, which is taken as an ideal starting point for the comparison of the coagulation kinetics of the six coagulants at the same strength. The average RCT time was 11 minutes, representing a normal time used during the production of both pressed and soft cheeses made from sheep's milk.

According to the analysis of the curd firming rate (CFR), the commercial coagulant FC obtained a higher CFR ($p < 0.05$) due to its higher specificity (100% chymosin), followed by the commercial coagulant AR and the freeze-dried vegetable coagulant CC, with no significant differences between them. The CFR of OP was significantly lower than FC, AR and CC ($p < 0.05$) but did not differ significantly from CH. The coagulant OP showed a good capacity to curdle sheep's milk, this result is in agreement with previous research that demonstrates its milk-clotting capacity in bovine milk (Bande-De León et al., 2023). Finally, the commercial vegetable coagulant CV presented a significantly ($p < 0.05$) inferior CFR than the rest of the coagulants.

The firmness value at the maximum velocity point (G'_{CFR}) was significantly ($p < 0.05$) higher for the coagulant CV, followed by FC, AR, and CC. The lowest values were obtained for the freeze-dried vegetable coagulants CH and OP. After 30 min of coagulation, significant differences ($p < 0.05$) were again observed in the firmness of the gels (G'_F), with FC being the coagulant with the highest firmness, in agreement with the results of CFR, followed by AR and CC. The coagulant CH presented intermediate values that did not differ significantly from CC. In contrast, significantly lower values ($p < 0.05$) were achieved by CV and OP, demonstrating that OP can be an alternative to commercial vegetable coagulants commonly extracted from the flowers of the thistle species *Cynara cardunculus* L. (Jacob et al., 2011). The kinetic results show that the extracts from OP have a lower CFR and final gel firmness than chymosin, behaving in the same way as the plant extracts from CC and CH, which have been extensively studied (Esteves et al., 2002, 2003a, 2003b).

To better understand the differences between the kinetic parameters CFR, G'_{CFR} and G'_F , the kinetic intervals t_0 , t_1 and t_{II} shown in Table 8 were studied. The commercial coagulant FC was the first to start aggregation with a t_0 value significantly ($p < 0.05$) lower than the rest. The greatest differences were found with the commercial coagulant CV, which presented a value significantly ($p < 0.05$) higher than the rest of both t_0 and t_1 , as well as a significantly ($p < 0.05$) lower value of t_{II} , due to slower aggregation kinetics as shown by its lower CFR. This lower speed, added to a longer time (t_0 and t_1) in starting aggregation, makes the time to reach CFR much higher, and therefore the firmness at its maximum speed was significantly higher ($p < 0.05$) than the rest of the coagulants. On the other hand, the vegetable extracts (CH, CC and OP) presented a time spectrum

similar to the commercial coagulants composed of chymosin, with t_0 values similar to AR and t_I and t_{II} values similar to AR and FC, except for OP, which has a secondary aggregation time lower than them.

3.3 Water Holding Capacity of Gels (WHC) and Whey Composition.

Table 9 shows the data obtained for the water holding capacity of the gels (WHC) and whey composition produced during the coagulation of ewe's milk with different coagulants.

The WHC of the plant extract OP did not differ significantly ($p > 0.05$) from the other coagulants. It could be observed how the main differences ($p < 0.05$) appeared between the vegetable extracts CH and CC; these coagulants presented the lowest WHC values, with respect to the coagulant FC which showed the highest WHC percentages. Ben Amira et al. (2017a) found that a CC extract showed lower values of WHC than chymosin and attributed this to the differences between coagulants in optimum milk clotting T. No significant differences in fat content were found in the composition of the whey released by the different curds after centrifugation. However, for nitrogenous compounds, the total protein lost in serum was significantly higher ($p < 0.05$) for the three plant extracts (CC, CH and OP). The FC coagulant was the most effective in terms of protein retention, being the one that lost the least amount through the serum, while AR and CV showed moderate protein loss.

Concerning non-protein nitrogen in the urea form, significant differences ($p < 0.05$) were found between coagulants. FC presented the minimum loss, while plant extracts CC and OP presented the highest urea values, followed by CH extract. These higher losses of nitrogen compounds when using vegetable

extracts are due to their higher proteolytic activity and are related to lower cheese yields (Jacob et al., 2010). Commercial coagulants AR and CV produced values of urea losses between FC and plant extracts, with significantly higher ($p < 0.05$) urea loss found when using CV than AR.

Given the large differences in genotype, production and method of obtaining the plant extracts, significant differences were found in the proteolytic activity and losses of nitrogenous compounds between CC and CV, both plant extracts from *Cynara cardunculus* L. (Gomes et al., 2019).

3.4 Multivariate Analysis: Principal Component Analysis

The results of the principal component (**PC**) analysis are shown in Figure 5. The analysis was carried out with the significant variables of the kinetic studies, WHC and whey composition. Two components explain 87.19% of the coagulants variability; 51.02% corresponds to PC1, and 36.17% to PC2. Through PC1, the coagulants were perfectly separated according to their origin. With negative PC1 values, there were the vegetable coagulants, CC, CH and OP extracts and the commercial coagulant CV, due to their start (t_0) and primary (t_i) aggregation times. At the other extreme, with positive PC1 values, were FC and AR, coagulants whose main enzyme is chymosin, which presented higher values of the kinetic parameters CFR and G'_F .

PC2 separates commercial coagulants from freeze-dried extracts. On the one hand, OP, CH and CC extracts have positive PC2 values due to the higher losses of urea and total protein in the whey obtained in the WHC analysis. On the other hand, CV presented negative PC2 values due to its higher G'_{CFR} value, which is related to the t_0 and t_i intervals, and the commercial coagulants AR and FC also

presented negative PC2 values due to their water retention capacity or lower losses of nitrogen compounds in whey. Overall, 3 well-differentiated groups were obtained: CC, CH and OP, with higher losses of nitrogen compounds in serum; CV, with a slower and weaker aggregation phase; and AR and FC, with the best kinetic values of speed and final firmness.

4. CONCLUSIONS

Response surface methodology was used for the optimization of T, pH, and [CaCl₂] parameters for better performance of MCA in ewe's milk. The optimum combination of T, pH and [CaCl₂] of OP is (T = 36°C, pH = 5.5, [CaCl₂] = 6 mM), being the same for CC and CH. Likewise, OP demonstrated kinetics similar to those obtained from more frequently used plant extracts: CC, CH, and CV. In addition, after coagulation, serum protein losses are high due to its strong proteolytic character. For all these reasons, OP extract can be an alternative for the production of sheep cheeses in which highly proteolytic coagulants are used. The optimization of parameters for the coagulation and the technological characterization of the gels of goat's milk was also investigated, and these results will be documented in a subsequent study. Further studies evaluating the effects of the OP extract on cheese characteristics are needed.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work is supported by the Ministry of Economy, Industry and Competitiveness -through the Agencia Estatal de Investigación (AEI-MINECO, PCI2019-103551, Spain) and the Italian Ministry of Education, University and Research (MIUR, Italy) and is part of the PRIMA programme supported by the

European Union. Project title: "Valorisation of thistle-curdled CHEESEs in MEDiterranean marginal areas" (<https://veggiemedcheeses.com/>). The authors have not stated any conflicts of interest.

REFERENCES

- Ahmed, I.A.M., E.E. Babiker, and N. Mori. 2010. pH stability and influence of salts on activity of a milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* seeds and its enzymatic action on bovine caseins. *Lebensm. Wiss. Technol.* 43:759-764. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.12.011>
- Alavi, F., and S. Momen. 2020. Aspartic proteases from thistle flowers: traditional coagulants used in the modern cheese industry. *Int. Dairy J.* 107. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104709>
- Anema, S. G., S.K. Lee, and H. Klostermeyer. 2007. Effect of pH at heat treatment on the hydrolysis of κ -casein and the gelation of skim milk by chymosin. *Lebensm. Wiss. Technol.* 40:99–106. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.08.002>
- Arango, O., A.J. Trujillo, and M. Castillo. 2015. Predicting coagulation and syneresis parameters of milk gels when inulin is added as fat substitute using infrared light backscatter. *J. Food Eng.* 157:63-69. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.02.021>
- Bande-De León, C., L. Buendía-Moreno, A. Abellán, P. Manzi, B. Al Mohandes Dridi, I. Essaidi, L. Aquilanti, and L. Tejada. 2023. Clotting and Proteolytic Activity of Freeze-Dried Crude Extracts Obtained from

Wild Thistles *Cynara humilis* L. and *Onopordum platylepis* Murb. Foods 12:2325. <https://doi.org/10.3390/foods12122325>

Ben Amira, A., A. Mokni, H. Yaich, M. Chaabouni, S. Besbes, C. Blecker, and H. Attia. 2017a. Technological properties of milk gels produced by chymosin and wild cardoon rennet optimized by response surface methodology. Food Chem. 237:150-158. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.105>

Ben Amira, A., I. Makhlouf, R.F. Petrut, F. Francis, J. Bauwens, H. Attia, S. Besbes and C. Blecker. 2017b. Effect of extraction pH on techno-functional properties of crude extracts from wild cardoon (*Cynara cardunculus* L.) flowers. Food Chem. 225:258-266. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.040>

Brutti, C. B., M.F. Pardo, N.O. Caffini., and C.L. Natalucci. 2012. *Onopordum acanthium* L. (Asteraceae) flowers as coagulating agent for cheesemaking. Lebensm. Wiss. Technol. 45:172-179. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.09.001>.

Castillo, M., F.A. Payne, C.L. Hicks, and M.B. Lopez. 2000. Predicting cutting and clotting time of coagulating goat's milk using diffuse reflectance: effect of pH, temperature and enzyme concentration. Int. Dairy J. 10:551-562. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(00\)00086-8](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(00)00086-8)

Chazarra, S., L. Sidrach, D. López-Molina, and J.N. Rodríguez-López. 2007. Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke

- (*Cynara scolymus*, L.) flowers. *Int. Dairy J.* 17:1393-1400.
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.04.010>
- Christen, C., and E. Virasoro. 1935. Présures végétales. Extraction et propriétés. *Le Lait* 15:354-363. <https://doi.org/10.1051/lait:193514414>
- Esteves, C. L. C., J. A. Lucey, D. B. Hyslop, and E. M. V. Pires. 2003a. Effect of gelation temperature on the properties of skim milk gels made from plant coagulants and chymosin. *Int. Dairy J.* 13:877–885.
[https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00114-6](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00114-6)
- Esteves, C. L. C., J. A. Lucey, and E. M. V. Pires. 2002. Rheological properties of milk gels made with coagulants of plant origin and chymosin. *Int. Dairy J.* 12:427-434. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00170-4](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00170-4).
- Esteves, C. L. C., J. A. Lucey, T. Wang, and E. M. V. Pires. 2003b. Effect of pH on the gelation properties of skim milk gels made from plant coagulants and chymosin. *J. of Dairy Sci.* 86:2558–2567.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73850-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73850-8)
- Fernández-Salguero J., and E. Sanjuán. 1999. Influence of vegetable and animal rennet on proteolysis during ripening in ewe's milk cheese. *Food Chem.* 64:177-183. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00149-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00149-6)
- Foligni, R., C. Mannozi, M. Gasparrini, N. Raffaelli, F. Zamporlini, L. Tejada, C. Bande-De León, R. Orsini, P. Manzi, M.G. Di Costanzo, M. Ritota, L. Aquilanti, and M. Mozzon. 2022. Potentialities of aqueous extract from cultivated *Onopordum tauricum* (Willd.) as milk clotting agent for

cheesemaking. Food Res. Int. 158.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111592>

Frederiksen, P. D., K. K. Andersen, M. Hammershøj, H. D. Poulsen, J. Sørensen, M. Bakman, K. B. Qvist, and L. B. Larsen. 2011. Composition and effect of blending of noncoagulating, poorly coagulating, and well-coagulating bovine milk from individual Danish Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 94:4787-4799. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4343>.

Galán, E., L. Cabezas, and J. Fernández-Salguero. 2012. Proteolysis, microbiology and sensory properties of ewes' milk cheese produced with plant coagulant from cardoon *Cynara cardunculus*, calf rennet or a mixture thereof. *Int. Dairy J.* 25:92-96.

<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.02.001>

Gomes, S., A.T. Belo, N. Alvarenga, J. Dias, P. Lage, C. Pinheiro, C. Pinto-Cruz, T. Brás, M.F. Duarte, and A.P.L. Martins. 2019. Characterization of *Cynara cardunculus* L. flower from Alentejo as a coagulant agent for cheesemaking. *Int. Dairy J.* 91:178-184.

<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.09.010>.

ISO/IDF (International Standards Organization/International Dairy Federation). 2007. Milk - Determination of total milk-clotting activity of bovine rennets. ISO 11815/IDF 157. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.

- Jacob, M., D. Jaros., and H. Rohm. 2011. Recent advances in milk clotting enzymes. *Int. J. Dairy Technol.* 64:14-33. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00633.x>.
- Jacob, M., D. Jaros., and H. Rohm. 2010. The effect of coagulant type on yield and sensory properties of semihard cheese from laboratory-, pilot- and commercial-scale productions. *Int. J. Dairy Technol.* 63:370-380. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00598.x>
- Marcos, A., M.A. Esteban, E. Martínez, M. Alcala, and J. Fernández-Salguero. 1980. Thermal inactivation of proteinases from the flowers of the cardoon *Cynara humilis* L.: kinetic and thermodynamic parameters. *Arch. de Zootec.* 29:283-294.
- Martínez, E., and M.A. Esteban. 1980. Clotting activity of an extract from the flowers of the cardon *Cynara humilis*. *Arch. de Zootec.* 29:107-116.
- Mozzon, M., R. Foligni, C. Mannozi, F. Zamporlini, N. Raffaelli, and L. Aquilanti. 2020. Clotting properties of *Onopordum tauricum* (Willd.) aqueous extract in milk of different species. *Foods* 9:692. <https://doi.org/10.3390/foods9060692>
- Muñoz, M., D. Fernández, J.M. Fresno, and D. Delgado. 2023. Effect of high hydrostatic pressure processing on the rennet coagulation kinetics and physicochemical properties of sheep milk rennet-induced gels. *J. Dairy Sci.* 106:2314-2325. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-21879>
- Nájera, A. I., M. de Renobales, and L. J. R. Barron. 2003. Effects of pH, temperature, CaCl₂ and enzyme concentrations on the rennet-clotting

- properties of milk: a multifactorial study. *Food Chem.* 80:345–352.
[https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00270-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00270-4)
- Nicosia, F.D., I. Puglisi, A. Pino, C. Caggia, and C.L. Randazzo. 2022. Plant milk-clotting enzymes for cheesemaking. *Foods* 11:871.
<https://doi.org/10.3390/foods11060871>
- Ordiales, E., A. Martín, M.J. Benito, S. Ruiz-Moyano, G. Gallardo, and M.D. Córdoba. 2016. Characterisation of the vegetable rennets used for ‘Torta del Casar’ cheesemaking by a protein profile method. *Int. J. of Dairy Technol.* 69:272-281. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12254>
- Rampanti, G., L. Belleggia, F. Cardinali, V. Milanović, A. Osimani, C. Garofalo, I. Ferrocino, and L. Aquilanti. 2023. Microbial dynamics of a specialty italian raw ewe’s milk cheese curdled with extracts from spontaneous and cultivated *Onopordum tauricum* Willd. *Microorganisms* 11:219. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010219>
- Roseiro, L.B., M. Barbosa, J.M. Ames, and R.A. Wilbey. 2003. Cheesemaking with vegetable coagulants - the use of *Cynara* L. for the production of ovine milk cheeses. *Int. J. Dairy Technol.* 56:76-85.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-0307.2003.00080.x>
- Slamani, R., R. Labadi, M.B. Errahmani, and M.M. Bellal. 2018. Purification and characterisation of milk-clotting and caseinolytic activities of pepsin isolated from adult sheep abomasa. *Int. J. of Dairy Technol.* 71:764-770.
<https://doi.org/10.1111/1471-0307.12492>

- Tamer, I.M. 1993. Identification and partial purification of a novel milk clotting enzyme from *Onopordum turcicum*. *Biotechnol. Lett.* 15:427-432. <https://doi.org/10.1007/BF00128289>.
- Tejada, L., and J. Fernández-Salguero. 2003. Chemical and microbiological characteristics of ewe milk cheese (Los Pedroches) made with a powdered vegetable coagulant or calf rennet. *Ital. J. Food Sci.* 15:125-131.
- Vianna, F. S., A. C. V. C. S. Canto, B. R. C. da Costa-Lima, A. P. A. A. Salim, M. P. Costa, C. F. Balthazar, B. R. Oliveira, R. P. Rachid, R. M. Franco, C. A. Conte-Junior, and A. C. O. Silva. 2017. Development of new probiotic yoghurt with a mixture of cow and sheep milk: effects on physicochemical, textural and sensory analysis. *Small Rumin. Res.* 149:154–162. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.02.013>
- Vioque, M., R. Gómez, E. Sánchez, C. Mata, L. Tejada, and J. Fernández-Salguero. 2000. Chemical and microbiological characteristics of ewes' milk cheese manufactured with extracts from flowers of *Cynara cardunculus* and *Cynara humilis* as coagulants. *J. Agric. Food Chem.* 48:451-456. <https://doi.org/10.1021/jf990326v>
- Zikiou, A., and M.N. Zidoune. 2019. Enzymatic extract from flowers of Algerian spontaneous *Cynara cardunculus*: Milk-clotting properties and use in the manufacture of a Camembert-type cheese. *Int. J. of Dairy Technol.* 72:89–99. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12563>

Table 1. Chemical composition of raw milk samples from ewes

Fat (g/100g)	Protein (g/100g)	Lactose (g/100g)	Total solids (g/100g)	Urea (mg/Kg)
7.05	4.97	4.66	17.594	607

Table 2. Dose of coagulants used

	Type of milk coagulant ¹					
	FC	AR	CC	CH	OP	CV
Dose (g/L)	0.25	0.24	0.35	0.51	5.35	0.28

¹FC = coagulant produced by fermentation, AR = commercial liquid animal rennet, CC = *Cynara cardunculus* L., CH = *Cynara humilis* L., OP = *Onopordum platylepis* Murb., CV = commercial vegetable coagulant from *Cynara cardunculus* L.

Table 3. Experimental design for the evaluation of the effect of T, pH and [CaCl₂] on the milk clotting activity of AR and plant coagulants CC, CH and OP

Run	Variables ¹			MCT ²			
	T	pH	[CaCl ₂]	AR	CC	CH	OP
1	33	5.5	6	58	99.5	104	729.5
2	36	5.5	2	68.5	72.5	89	1101
3	36	6.5	6	56	62	66.5	582.5
4	30	6	4	70.5	125	146	1449
5	33	6.5	4	69	144	137	1067
6	30	6.5	2	85	158.5	173.5	1652
7	30	5.5	6	64	118.5	140	963
8	33	6	2	82	171	172.5	1403.5
9	30	6.5	6	69.5	100.5	121.5	1028
10	36	5.5	6	43	56.5	67	673.5
11	36	6.5	2	70	81.5	93	987
12	30	5.5	2	79	149	181	1924.5

¹ T = temperature, [CaCl₂] = calcium chloride concentration

² Results are mean of two experiments expressed in seconds

Table 4. Regression coefficients and analysis of variance of response surface for the effect of T, pH, and [CaCl₂] on MCT

Term	AR			CC			CH			OP		
	Estimates	F Ratio	p-Value	Estimates	F Ratio	p-Value	Estimates	F Ratio	p-Value	Estimates	F Ratio	p-Value
Intercept	67.5531		<.0001*	139.9406		<.0001*	138.1563		<.0001*	1130.0719		<.0001*
Linear												
T	-7.4984	145.7568	<.0001*	-30.7297	97.3641	<.0001*	-36.7031	117.7154	<.0001*	-276.5328	378.0141	<.0001*
pH	3.2547	30.5545	<.0001*	3.8109	1.6662	0.2177	-0.2344	0.0053	0.9428	-47.3484	12.3309	0.0035*
[CaCl ₂]	-8.7547	221.0739	<.0001*	-18.5609	39.5231	<.0001*	-20.2656	39.9315	<.0001*	-306.4016	516.3752	<.0001*
Quadratic												
T x T	-4.5391	12.5951	0.0032*	-37.5078	34.2065	<.0001*	-21.9844	9.9595	0.0070*	53.6328	3.3532	0.0884
pH x pH	-1.8203	1.2684	0.2790	-7.9141	0.9536	0.3454	-7.7969	0.7844	0.3908	-26.9609	0.5306	0.4784
[CaCl ₂] x [CaCl ₂]	5.6797	12.3484	0.0034*	4.3359	0.2862	0.6010	7.2031	0.6695	0.4269	-44.2109	1.4267	0.2521
Interactions												
T x pH	0.3750	0.3600	0.5581	2.8750	0.8416	0.3745	3.6875	1.1734	0.2970	0.3125	0.0005	0.9829
T x [CaCl ₂]	-1.1250	3.2399	0.0934	6.6250	4.4688	0.0529	5.5625	2.6700	0.1245	94.1875	43.3050	<.0001*
Ph x [CaCl ₂]	1.3781	5.1177	0.0401*	-1.8344	0.3606	0.5577	-0.2188	0.0043	0.9484	47.8719	11.7758	0.0041*

* Level of significance $p < 0.05$

Table 5. Polynomial model equation for the milk clotting time (MCT)

MCT	R ²	Adjusted R ²	F ratio	p Value*
<i>Animal rennet</i>				
-602.3188+(- 17.8180([CaCl ₂])+80.1219(pH)+30.0370(T)+1.4199([Ca Cl ₂]) ² +(-7.2813)(pH) ² +(- 0.5043(T) ² +1.3781([CaCl ₂])(pH)+(-0.1875)([CaCl ₂])(T)+0.25(pH)(T)	0.9714	0.9530	52.8536	<0.0001
<i>Cynara cardunculus</i>				
-4710.1438+(- 43.3836([CaCl ₂])+331.5844(pH)+248.8974(T)+1.0840([CaCl ₂]) ² +(-31.6563)(pH) ² +(-4.1675)(T) ² +(-1.8344)([CaCl ₂])(pH)+(1.1042([CaCl ₂])(T)+1.9167(pH)(T)	0.9352	0.8935	22.4364	<0.0001
<i>Cynara humilis</i>				
-2564.9375+(-53.8203)([CaCl ₂])+293.5313(pH)+130.5260(T)+1.8008([CaCl ₂]) ² +(- -31.1875)(pH) ² +(-2.4427)(T) ² +(-0.2188)([CaCl ₂])(pH)+0.9271([CaCl ₂])(T)+2.4583(pH)(T)	0.9314	0.8873	21.1284	<0.0001
<i>Onopordum platylepis</i>				
11045.5688+(-870.0414)([CaCl ₂])+1001.0656(pH)+(- 549.5266)(T)+(-11.0527)([CaCl ₂]) ² +(- 107.8438)(pH) ² +5.9592(T) ² +47.8719([CaCl ₂])(pH)+15.6 979([CaCl ₂])(T)+0.2083(pH)(T)	0.9874	0.9793	121.9524	<0.0001

*Level of significance p < 0.05.

Table 6. Optimum conditions

Milk coagulant	T	pH	[CaCl ₂]	Predicted MCT ¹	Desirability	Measured MCT ¹
AR	36	5.5	6	44.4875	0.876109	43
CC	36	5.5	6	51.3375	0.974036	56.5
CH	36	5.5	6	60.9375	0.978018	67
OP	36	5.5	6	622.95	0.907984	673.5

¹Results are expressed in seconds.

Table 7. Effect of the type of coagulant on coagulation parameters in ewe's milk

	MCA (IMCU/g)	RCT	CFR	G' _{CFR}	G' _F
FC	200.00±6.70 ^e	11.09±0.39 ^a	21.03±0.28 ^d	142.94±1.28 ^b	225.82±9.63 ^d
AR	205.76±8.02 ^e	10.77±0.33 ^a	18.74±0.73 ^c	140.41±5.56 ^b	273.90±13.99 ^c
CC	143.37±3.97 ^c	11.07±0.30 ^a	17.71±0.59 ^c	142.70±7.09 ^b	253.12±4.58 ^{bc}
CH	101.28±5.08 ^b	10.75±0.52 ^a	15.24±0.21 ^b	120.43±4.74 ^a	225.82±5.68 ^b
OP	9.07±0.02 ^a	11.00±0.02 ^a	15.56±0.09 ^b	127.44±2.11 ^a	198.50±16.93 ^a
CV	177.53±7.94 ^d	11.20±0.50 ^a	14.20±0.66 ^a	159.55±5.44 ^c	201.05±11.99 ^a

MCA: milk clotting activity, RCT = rennet coagulant time, CFR = curd firming rate, G'_{CFR} = static modulus value in CFR, G'_F = gel firmness after 30 min.

Results are mean ± standard deviation (SD).

^{a-d} different superscript letters in a column mean significant differences at $p < 0.05$ (Tukey's test).

Table 8. Effect of the type of coagulant on kinetic time intervals of ewe's milk gels

	t_0	t_I	t_{II}
FC	2.67±0.14 ^a	7.02±0.13 ^a	3.86±0.30 ^c
AR	3.28±0.16 ^{bc}	7.81±0.52 ^a	3.39±0.34 ^c
CC	3.56±0.17 ^c	7.17±0.86 ^a	4.02±0.71 ^c
CH	3.14±0.14 ^b	8.40±0.43 ^a	3.32±0.30 ^c
OP	3.46±0.24 ^{bc}	8.52±0.17 ^a	2.84±0.17 ^b
CV	4.16±0.25 ^d	11.81±0.88 ^b	1.11±0.44 ^a

t_0 = aggregation start time, t_I = primary aggregation time, t_{II} = secondary aggregation time

Results are mean expressed in minutes ± standard deviation (SD).

^{a-c} different superscript letters in a column mean significant differences at $p < 0.05$ (Tukey's test).

Table 9. Effect of the type of coagulant on the chemical composition of the whey and water-holding capacity (WHC) of ewe's milk gels

	Whey composition			
	¹ WHC (%)	¹ Fat (%)	¹ Protein (%)	Urea (ppm)
FC	93.68±1.03 ^b	0.25±0.10 ^a	1.80±0.01 ^c	507±30 ^a
AR	89.21±1.04 ^{ab}	0.25±0.08 ^a	1.98±0.04 ^b	625±22 ^b
CC	86.44±3.32 ^a	0.25±0.03 ^a	2.61±0.08 ^c	999±15 ^e
CH	87.38±1.86 ^a	0.25±0.05 ^a	2.49±0.03 ^c	938±28 ^d
OP	90.70±2.01 ^{ab}	0.24±0.01 ^a	2.57±0.02 ^c	976±41 ^e
CV	90.38±0.88 ^{ab}	0.25±0.09 ^a	2.04±0.01 ^b	687±34 ^c

¹Results are expressed as grams/100g of whey.

Results are mean ± standard deviation (SD).

^{a-e} different superscript letters in a column mean significant differences at $p < 0.05$ (Tukey's test).

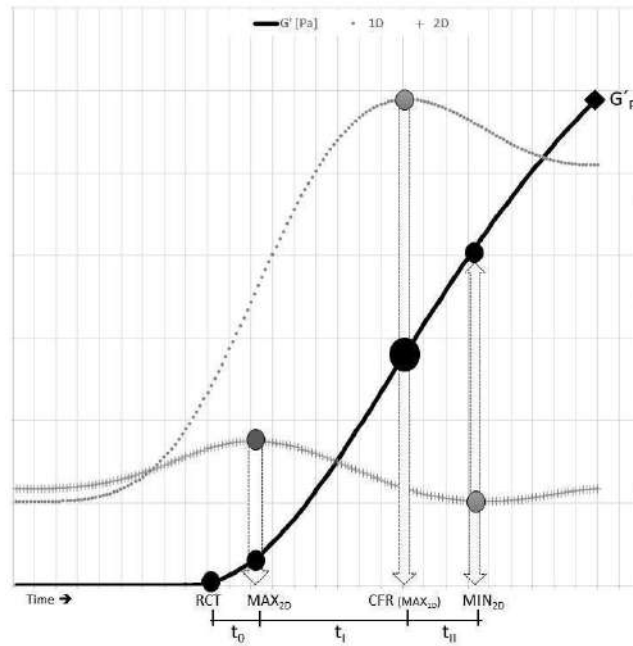
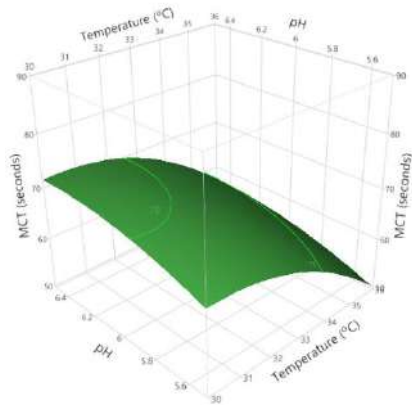
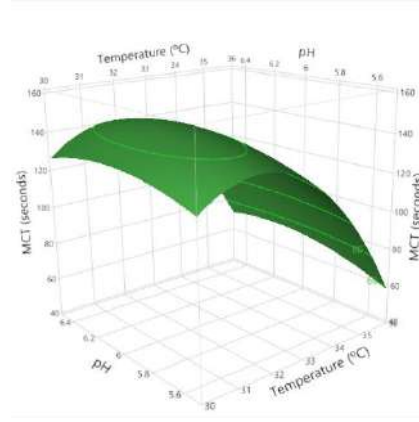


Figure 1. Representation of the coagulation kinetics by monitoring the elastic modulus (G') over time and calculating RCT, rennet clotting time; MAX2D, maximum of the second derivative; $CFR_{(MAX2D)}$, curd firming rate; G'_F , elastic modulus after 40 minutes; t_0 , time to initiate aggregation; t_I , primary aggregation time; t_{II} , secondary aggregation time; and MIN2D, minimum of the second derivative.

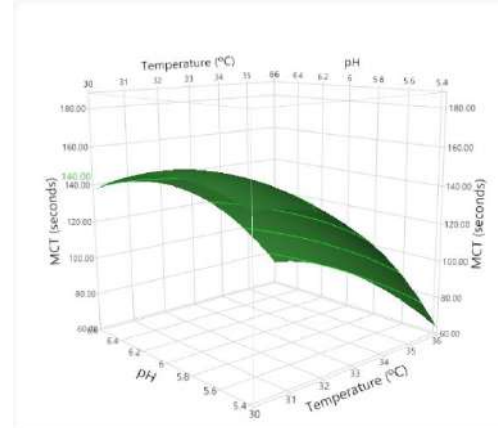
AR



CC



CH



OP

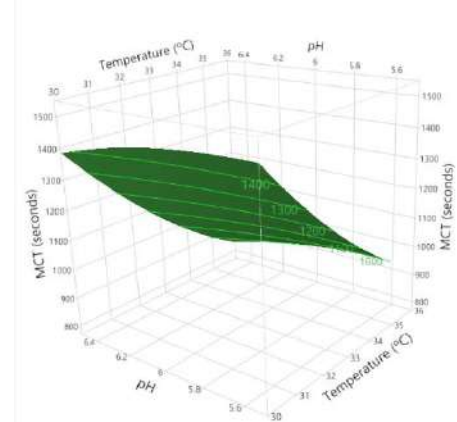
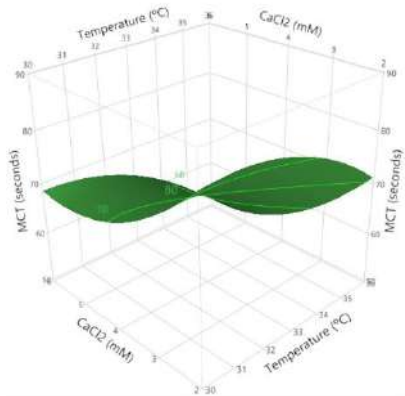
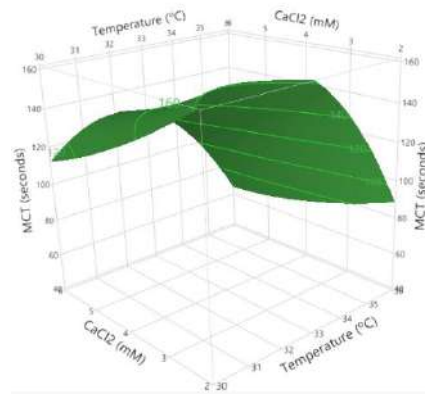


Figure 2. Response Surface plots for the effect of temperature (T) and pH on the milk clotting time (MCT) of animal rennet (AR), *Cynara cardunculus* L. (CC), *Cynara humilis* L. (CH), and *Onopordum platylepis* Murb. (OP), in ewe's milk.

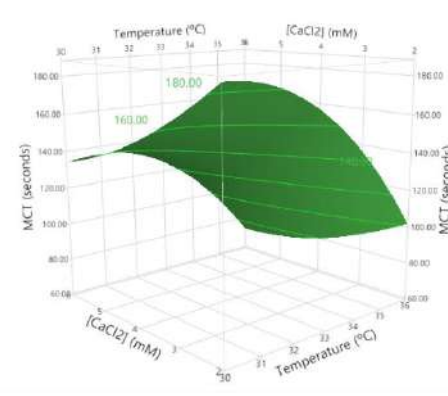
AR



CC



CH



OP

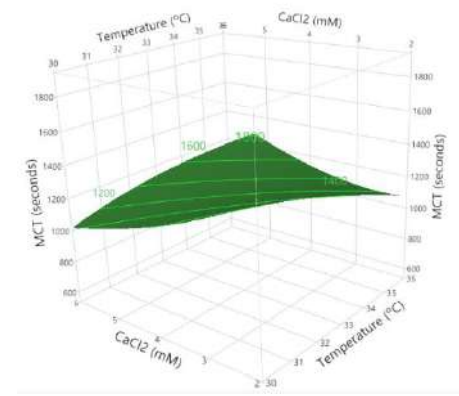
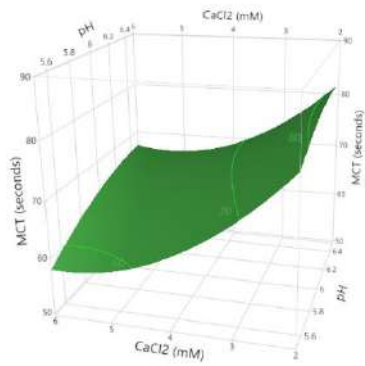
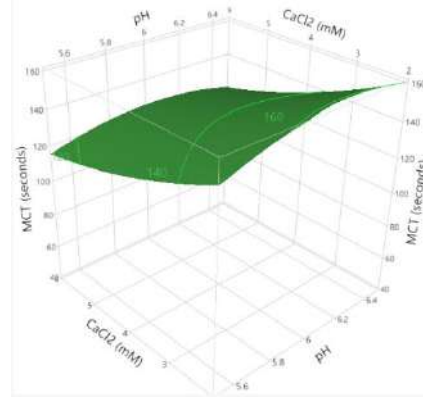


Figure 3. Response Surface plots for the effect of temperature (T) and calcium chloride concentration ($[CaCl_2]$) on the milk clotting time (MCT) of animal rennet (AR), *Cynara cardunculus* L. (CC), *Cynara humilis* L. (CH), and *Onopordum platylepis* Murb. (OP), in ewe's milk.

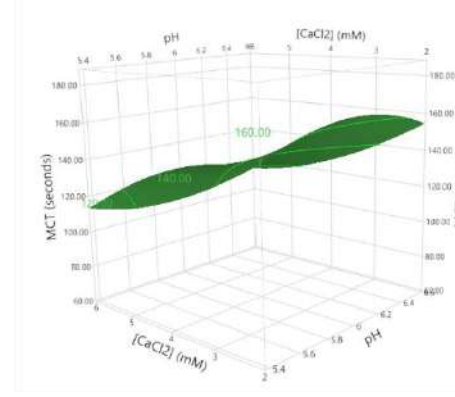
AR



CC



CH



OP

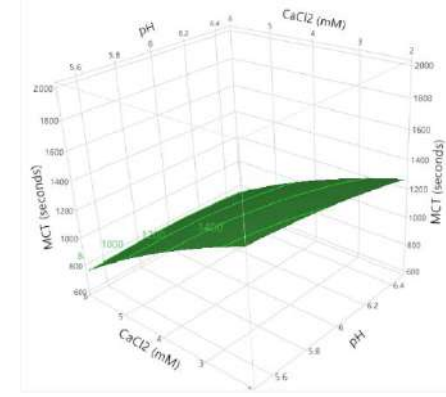


Figure 4. Response Surface plots for the effect of pH and calcium chloride concentration ([CaCl₂]) on the milk clotting time (MCT) of animal rennet (AR), *Cynara cardunculus* L. (CC), *Cynara humilis* L. (CH), and *Onopordum platylepis* Murb. (OP), in ewe's milk.

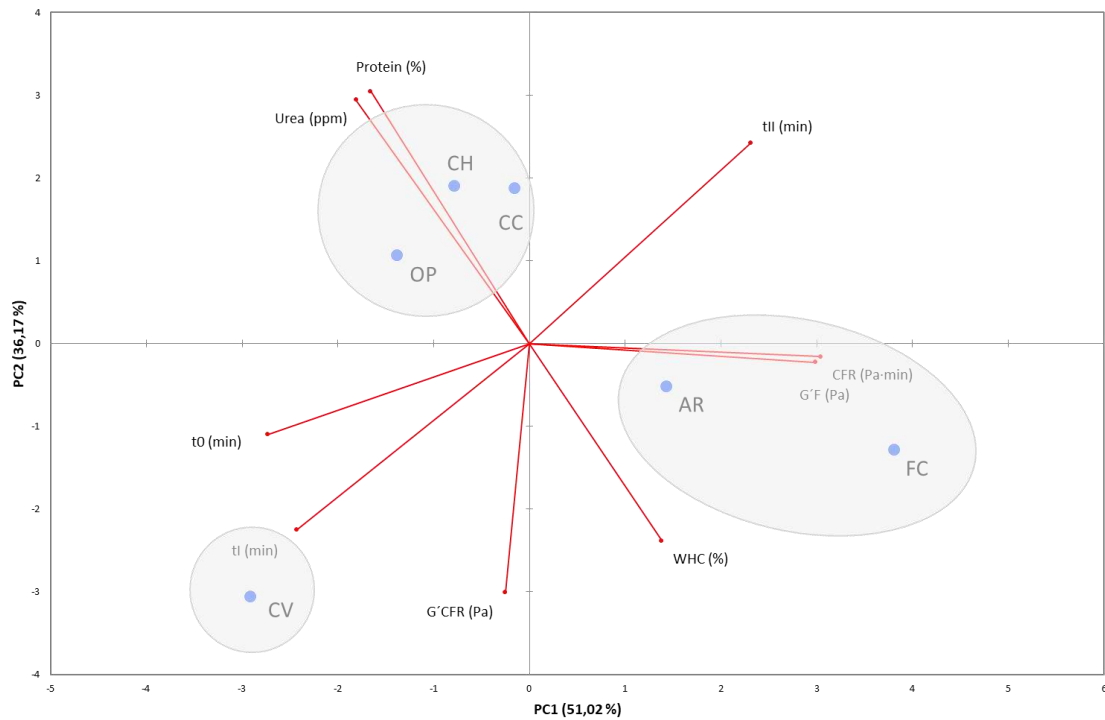


Figure 5. Principal component analysis biplot of the main components of whey composition and water holding capacity (WHC) of gels and coagulation kinetics characteristics evaluated in ewe's milk using coagulant produced by fermentation (FC), animal rennet (AR), commercial vegetable coagulant (CV), *Cynara cardunculus* L. (CC), *Cynara humilis* L. (CH), and *Onopordum platylepis* Murb. (OP). CFR = curd firming rate; G'_{CFR} = value of elastic modulus in CFR; G'_F = elastic modulus after 40 minutes; t_0 : time to initiate aggregation; t_I : primary aggregation time; t_{II} : secondary aggregation time.

5.1.4. Validation of freeze-dried plant extract obtained from *Onopordum platylepis* Murb. as goat's milk coagulant.

Validation of freeze-dried plant extract obtained from *Onopordum platylepis* Murb. as goat's milk coagulant.

C. Bande-De León^{a,*}, D. Delgado^b, D. Fernández^c, M. Mozzon^d, A. Abellán^a, L. Aquilanti^d and L. Tejada^a

^a Department of Human Nutrition and Food Technology, Universidad Católica de Murcia-UCAM, Campus de los Jerónimos, 30107 Murcia, Spain

^b Estación tecnológica de la Leche, ITACYL, Junta de Castilla y León, 34071 Palencia, Spain

^c Department of Food Hygiene and Technology, León University, 24071 León, Spain

^d Departament of Agricultural, Food and Environmental Sciences, Università Politecnica delle Marche, Via Brecce Bianche, 60131 Ancona, Italy

*Corresponding author: Cindy Bande-De León; Email: cmbande@ucam.edu; Tel.: +34 653264731

ABSTRACT

In recent years, the search for new plant species for use as milk coagulating agents in cheese production has increased. The coagulation kinetics and technological properties of *Onopordum platylepis* Murb. (OP) were evaluated for the first time in goat's milk. Optimal conditions (T = 36°C, pH 6.5, y [CaCl₂] = 6 mM) were established to maximize coagulant activity in ewe's milk using response surface methodology to determine the effects of interactions of the variables of temperature (30, 33 y 36 °C), pH (5.5, 6.0, y 6.5), and calcium chloride concentration (2, 4, y 6 mM) and compared with the thistle species *Cynara cardunculus* L. (CC) and *Cynara humilis* L. (CH). For all coagulants, an increase in temperature and calcium chloride concentration and a decrease in pH, resulted in a decrease in milk clotting time. The rheological properties of OP gels produced at a temperature of 32 °C and a pH of 6.5 were compared with

CC, CH, AR, a commercial vegetable coagulant (CV), and a fermented chymosin coagulant (FC). Analysis were performed at the same dose (50 IMCU/L of milk) for a same rennet coagulation time (RCT) and coagulation kinetic curve were divided in 3 time intervals: start of aggregation (t_0), increasing aggregation rate interval (t_I), and decreasing aggregation rate Interval (t_{II}). In the curd firming rate (CFR) analysis, the velocity of OP was similar to that of CH and lower than that of CC, AR and FC. The firmness of the gels produced by OP was similar to that of CH and lower than that of AR and FC. The water holding capacity (WHC) of OP was similar to CH and CC, while the losses of protein and nitrogenous components were lower for OP than for CH and CC.

Key Words: milk clotting activity, *Onopordum platylepis*, vegetable coagulant, coagulation kinetics, goat milk.

1. INTRODUCTION

Since many years, thistle flowers have been used for the production of artisan cheeses, especially in southern Europe and northern Africa, which are characterized by a unique texture, aroma and flavor (Alavi and Momen 2022). The CC species is the most exploited for this purpose, being used as a coagulating agent in many varieties of world-famous cheeses with protected designation of origin (**PDO**). Specialty cheeses Serra da Estrela, Serpa, Torta del Casar, Queso de la Serena, Caciofiore and Los Pedroches (from ewe's milk), as well as Los Ibores (from goat's milk) and Flor de Guía (from a mixture of ewe's and cow's milk) are some of the cheeses traditionally made with thistle flowers in Portugal, Spain and Italy (Fernández-Salguero and Sanjuán 1999; Rampanti et al., 2023). Cheese production with vegetable coagulants from thistle flowers is

more widespread in raw ewe's milk, however, the use of vegetable coagulants from thistle flowers has also been evaluated in PDO Murcia al vino cheese made from goat's milk. (Tejada et al., 2008).

When CC flowers are not sufficient to cover the demand for these cheeses, other species of the *Cynara* L. genus are used, such as *Cynara humilis* (Ordiales et al., 2016). This is one of the reasons why it is interesting and important to explore new thistle species for their exploitation in cheesemaking. In this regard, some research has demonstrated the milk clotting capacity of vegetable aspartic proteases from species such as *Onopordum acanthium* (Brutti et al., 2012), *Onopordum turcicum* (Tamer 1993), and *Onopordum tauricum* (Foligni et al., 2022). In our previous studies on *Onopordum platylepis* (Bande-De León et al., 2023), we investigated its coagulant and proteolytic capacity, demonstrating its applicability in cheese production; however, its rheological properties have not been studied so far. The knowledge of the optimal combination of the technological parameters of coagulants can be useful for their application in the cheesemaking process, similarly, in order to improve the quality and cheese yield, it is important to know the physical evolution of the gels during the whole coagulation process by studying the coagulation kinetics (Muñoz et al., 2023).

Most of the available studies that evaluate the effect of the factors involved in the coagulation of milk in the cheese-making process use conventional methods that do not allow assessment of the interaction between these factors (Mozzon et al., 2020). The response surface methodology (**RSM**) allows evaluating the effect of individual variables and the effect of their interaction, as well as establishing the optimal conditions that maximize the milk clotting activity (**MCA**).

One of the objectives of this study is to optimize the conditions of temperature (T), pH and calcium chloride concentration ([CaCl₂]) in *Onopordum platylepis* Murb. MCA in order to minimize the milk coagulation time (MCT). The second objective is to determine the applicability of the extract in cheese making by studying milk gelation through the evaluation of coagulation kinetics and rheological characteristics of goat milk gels compared to other coagulants.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Material

2.1.1 Freeze-dried Extracts Preparation

The plant coagulants from *Cynara cardunculus* L. (CC), *Cynara humilis* L. (CH), and *Onopordum platylepis* Murb. (OP) were obtained from the styles and stigmas of spontaneously grown flowers. CC and CH flowers were collected from Cáceres, Spain, and the OP flowers from Sousse, Tunisia. The freeze-dried extracts were obtained as described by Bande-De León (2023).

2.1.2 Preparation and Chemical Characterization of Milk Substrate:

Raw milk from Murciano-Granadina goat was collected from a local farm in Palencia, Spain. To prevent microbial growth, azidiol (3 mL/L-1) was added, and milk was kept refrigerated (4°C) until use to maintain its physicochemical properties intact. Raw milk was analyzed for fat, protein, lactose, total solids, and urea content in a MilkoScan FT+ (FOSS, Hilleroed, Denmark). Data are shown in Table 1.

The milk was skimmed by centrifugation (5000g and 4°C for 20 min) for better visualization of the beginning of flocculation in the study of the milk clotting activity (**MCA**). For conservation, skimmed milk was freeze-dried and frozen (-20°C).

2.2 Milk Clotting Activity Assay by Response Surface Methodology:

A total of twelve experiments were statistically designed (Table 3) using RSM with 3 level discrete variables, T (30, 33 and 36 °C), pH (5.5, 6.0 and 6.5), and [CaCl₂] (2, 4 and 6 mM) affecting milk clotting. The simultaneous effect of the variables was studied and optimized by estimating the coefficients of the structured mathematical model and checking the prediction of the responses and the adequacy of the model.

For the experimental design, the D-optimal criterion was used to minimize the determinant of the variance matrix of the regression parameters. The order of the experiments was completely randomized and each experiment was carried out in double.

To determine the milk clotting, the freeze-dried skimmed milk powder was reconstituted according to its dry extract content (11.93% w/w) in calcium chloride solutions prepared at the different concentrations and pH of the study. The assays were carried out by adding the coagulant to a 10 mL aliquot of the reconstituted milk previously preheated at the desired T. The milk clotting time (**MCT**) was measured in seconds from the addition of the milk coagulant to the first visualization of clots on the walls of the test tube. The MCA of the freeze-dried plant extracts were compared with a commercial liquid Lamb rennet (75 RU) provided by Cuajos Caporal (Valladolid, Spain). The freeze-dried vegetable extracts (CC, CH, OP) were reconstituted in distilled water at a concentration of

20 mg/mL, and 1 mL was added. In the case of animal rennet (**AR**), following the manufacturer's instructions, 2.5 μ L of rennet was added.

2.3 Rheological Assay

2.3.1 Milk Coagulation Kinetics Assay:

To characterize the rheological properties of the gels, 200 grams of milk were weighed and heated at 32°C in a thermostatic bath. A calcium chloride solution (2.3 mM) and the milk coagulants were added. The coagulation kinetics of the freeze-dried extract of OP was compared with freeze-dried plant extracts of CH and CC; and with three commercial coagulants: 100% chymosin produced by fermentation (**FC**) (Chymax M 200 IMCU/mL, Chr Hansen, Denmark), animal rennet (AR) (75 RU, Cuajos Caporal, Spain) and a liquid vegetable coagulant from *Cynara cardunculus* (**CV**) (1:15000, Laboratorios Arroyo, Spain). The coagulants were compared at the same dose (50 IMCU/L of milk), taking as a reference the strength of the commercial coagulant FC. The amount of each of the coagulants was calculated experimentally (Table 2) to obtain the same rennet clotting time (**RCT**) as FC (Esteves et al., 2002) The MCA (IMCU/g of coagulant) of each coagulant at pH 6.5 was calculated according to international standards (ISO/IDF, 2007). After a light homogenization, 18 mL aliquots were taken and introduced into the cup/cylinder system (CC27/T200/AL, Anton Paar, Austria) of the rheometer (Physica MCR 301, Anton Paar, Austria) and the milk clotting test was carried out at a controlled temperature of 32 °C and with a constant oscillation at a 0.5% strain rate and a frequency of 1 Hz (Muñoz et al., 2023). The elastic modulus (G') and viscous modulus (G'') were monitored for 30 min, and the analysis of the firmness curve (G' vs time) and its first and second derivative

was performed to obtain the coagulation parameters, following the method of Frederiksen et al. (2011), using the Rheometer software (Rheoplus 3.62, Anton Paar, Austria). The coagulation curve parameters analyzed (Figure 1) were:

- RCT, the time at which the first flocs are reached, is calculated as the cut-off point between the G' and G'' curves.
- CFR, calculated as the slope of the curve G' vs t at the maximum of the first derivative (1D). The time (**MAX_{1D}**) and firmness (**G'_{CFR}**) coordinates were calculated at this point.
- Firmness of the gel at the end of the test (**G'_F**).
- Locating the maximum and minimum of the second derivative, the zone of maximum variation of CFR is delimited (Arango et al., 2015). To better understand the changes experienced, this zone was divided into three time intervals: 0) Start of aggregation after hydrolysis (**t_0**); I) interval of increasing aggregation rate (**t_I**) or primary aggregation zone; II) interval of decreasing aggregation rate (**t_{II}**) or secondary aggregation zone.

2.3.2 Analysis of Water Holding Capacity (WHC) and Whey Composition:

After the addition of the coagulants to the milk, aliquots of 50mL were taken and kept in a thermostatic bath at 32°C until the maximum speed point was reached (G'_{CFR}). As described by Muñoz et al. (2023) the gels were kept 24 hours under refrigeration and then centrifuged at 4000x g and 5°C for 10 minutes. The supernatant obtained was weighed and analyzed for fat, total protein, and urea content using a CombiFoss7 instrument (FOSS, Hilleroed, Denmark). The formula proposed by Vianna et al. (2017) was used to calculate WHC:

$$\text{WHC (\%)} = 100 \frac{(Y - DW)}{Y}$$

where Y is the total curd weight; and DW is the supernatant weight.

2.4 Statistical Analysis

The experimental design of the MCA assay and statistical analysis was performed by RSM using JMP Software Version 17.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) to investigate three different parameters (T, pH, and [CaCl₂]) affecting the total milk clotting activity.

The RSM model was validated further by comparing the predicted versus experimental responses. The optimal levels of three variables were selected using a second-order polynomial equation by the standard least squares regression methodology to estimate the parameters of the mathematical model. The coefficient of determination R² was determined to assess the quality of fit of the equation. To assess the statistical significance of the model, analysis of variance (ANOVA) was performed.

For the analysis of coagulation kinetics and rheological properties, four coagulation tests were carried out with each of the coagulants. To determine significant differences ($p < 0.05$) between the coagulants, the rheological data were statistically analyzed by one-factor analysis of variance (ANOVA) using SPSS 9.0 software (IBM Spain, Spain). When ANOVA showed significant differences, an estimated marginal means post hoc analysis by using Tukey's test was performed. Principal component analysis was conducted using XLSTAT Pro 2007 (Addinsoft, France) statistical software for multivariate analysis.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Milk Clotting Activity (MCA) Assay by Response Surface Methodology (RSM)

The responses at each design test of the three-factor response surface analysis are shown in Table 3. The results obtained from the ANOVA and Fisher's F-test of the regression coefficients are summarised in Table 4. For linear factors, the MCT of all coagulants tested was significantly affected ($p < 0.05$) by T and $[\text{CaCl}_2]$. In the case of the linear factor pH, it significantly influenced the activity of AR and OP. The individual effect of T, pH and $[\text{CaCl}_2]$ factors on the MCA of OP was evaluated in cow's milk in a previous investigation (Bande-De León et al., 2023), showing that OP activity is much more favored by increasing T and $[\text{CaCl}_2]$ than the activity of CC and CH extracts, agreeing with the results collected herein. However, it also showed that pH variations only significantly affected the CC activity, in contrast to the findings presented here.

As shown in Table 4, the quadratic effect of the variable T had a significant impact ($p < 0.05$) on the MCT of the three vegetable coagulants, CC, CH and OP. The MCT of OP was significantly affected by the quadratic effect of $[\text{CaCl}_2]$. However, the pH quadratic effect did not significantly affect the MCT of any of the coagulants. CC was the only coagulant whose MCT was influenced by the interaction between T and $[\text{CaCl}_2]$ parameters; it is known that the increase in T and $[\text{CaCl}_2]$ promote protein aggregation (Esteves et al., 2003a; Zikiou and Zidoune, 2019). OP was the only coagulant whose MCT was significantly affected by the interaction between T and pH and by the interaction between pH and $[\text{CaCl}_2]$ (Table 4). The performance of OP with respect to these variables agrees with observations on different vegetable aspartic proteases, which have shown to have a thermophilic nature and an acidic character, explaining their increased activity at high T and low pH values. In particular, the effect of the interaction

between T and pH was studied by Castillo et al., 2000 demonstrating its influence on the gel firming rate in goat's milk; in addition, the effect of the interaction between pH and $[CaCl_2]$ has been shown to influence the destabilization of the casein micelle system due to electrostatic interactions between Ca^{2+} and H^+ ions (Nàjera et al., 2003). Comparing between vegetable coagulants under the same test conditions, OP was the coagulant that presented higher MCT in all cases, while the MCT of CC and CH were similar, in agreement with previous investigation (Bande-De León et al., 2023) in which OP generally showed lower clotting activity than CC and CH while these last demonstrated very similar performance.

The response surface three-dimensional plots of the effect of T, pH and $[CaCl_2]$ on the MCT are given in Figures 2-4. In these, the linear and quadratic effects and the interactions between the factors studied can be observed. Figures 2 and 3 show that an increase in T decreases the MCT of all coagulants, similarly, Figures 3 and 4 exhibit that an increase in $[CaCl_2]$ achieves a decrease in the MCT of all coagulants. On the other hand, at acid pH values, the MCT is decreased, however, it can be seen that this effect is significant only for AR and OP (Figures 2 and 4).

Table 5 shows the predicted model equations for the MCT responses and the significant reliability of the polynomial model fit analyzed by ANOVA ($p < 0.05$) and measured by the coefficient of determination (R^2). The quality of data fitting was measured by the adjusted R^2 . All the polynomial models showed significant reliability ($p < 0.0001$). The T, pH and $[CaCl_2]$ conditions at which the MCT of each of the coagulants is minimized are shown in Table 6. The good fit of the

model is evidenced by the consistency of the measured results with the results predicted by the model equations. For all coagulants, the optimum values of T and [CaCl₂] were the maximum values studied, being 36°C and 6mM, respectively. The effect of both factors on the MCA has been extensively studied and it is known that an increase in temperature and the addition of CaCl₂ reduces the MCT and favors milk gelation and, consequently, curd formation (Nájera et al., 2003; Chazarra et al., 2007; Foligni et al., 2022). Regarding pH, the optimum value of this factor for AR and CC is the lowest of the range explored (5.5 - 6.5), while for OP, it is the maximum of this range; CH presented an optimal intermediate value. This behavior of plant extracts was similar to that found in a study evaluating the effect of different variables on MCA in cow's milk of CC, CH and OP; the pH at which these extracts showed higher MCA was the lowest value explored (5.0) for CC and CH, and slightly higher (5.5) for OP (Bande-De Léon et al., 2023).

3.2 Coagulation Kinetics and Gelation Properties

When comparing the MCA of the different coagulants (Table 7), significant differences ($p < 0.05$) were obtained among all of them. The highest MCA was obtained with the commercial coagulant 100% chymosin (FC), followed by the commercial coagulants CV and AR, while the extracts CC, CH and OP presented, respectively, an activity 54, 75 and 96% lower than FC.

As shown in Table 7, no significant differences ($p > 0.05$) were found between all the coagulants for RCT values, which was considered an adequate starting point for kinetic comparison. Significant differences were found in the rest of the parameters analyzed ($p < 0.05$). The highest CFR values were obtained with the coagulants FC, AR and CC, followed by CV, while CH and OP presented the

lowest maximum velocity values with no significant differences between them. The coagulant OP showed a good capacity to curdle goat's milk, this result is in agreement with previous research that demonstrates its milk-clotting capacity in bovine milk (Bande-De León et al., 2023). The firmness reached by CH and OP at their maximum velocity point presented significant differences ($p < 0.05$) with respect to the rest of the coagulants, which is related to their lower CFR. This correlation between firmness and CFR is maintained throughout coagulation, where the lowest G'_F values were obtained with the vegetable coagulants CH and OP, followed by CC and CV. This similarity between CH and OP shows that OP can be an alternative to those coagulants elaborated with CH flowers that are often used in cheese making as a substitute for the traditional CC (Ordiales et al., 2016). The highest final firmness values were obtained with FC, while the AR firmness value was intermediate, not differing significantly neither with FC nor with CV and CC. The OP extract behaved similarly to the CH and CC plant extracts, exhibiting lower CFR and lower final gel firmness than chymosin, consistent with previous studies (Esteves et al., 2002, 2003a, 2003b).

The kinetic parameters shown in Table 7 correspond and are explained by the time intervals into which the kinetics are divided (Table 8). The highest values of aggregation initial time (t_0) after hydrolysis were obtained with the coagulant OP. As aggregation progresses, the duration of the primary phase (t_I) was significantly longer ($p < 0.05$) for OP and CV coagulants compared to CC, AR and FC, while CH coagulant presented intermediate values. In the duration of the secondary phase (t_{II}) the differences between the coagulants are minor and significant differences ($p < 0.05$) were only obtained between the FC and OP coagulants, showing the longest and shortest time, respectively.

3.3 Water Holding Capacity of Gels (WHC) and Whey Composition.

Table 9 shows the values of water holding capacity (WHC), and whey fat, total protein and non-protein nitrogen losses resulting from syneresis of the curds in the WHC analysis. The vegetable coagulants CH, CC and OP had a significantly lower WHC than the rest. On the other hand, FC was the coagulant with the highest WHC. AR presented an intermediate WHC, similar to FC. Ben Amira et al. (2017) found higher values of WHC in chymosin gels than in CC gels attributing this contrast to the difference in temperature condition for milk-clotting between each coagulant.

As for the composition of the whey, no significant differences were found in the amount of fat, although there were significant differences in the concentration of nitrogenous compounds. The highest concentration of both protein and urea was obtained with the vegetable coagulants CH and CC, followed by OP and CV, with no significant differences between them. The lowest losses of protein and urea are obtained with the coagulants AR and FC, with no significant differences between them. The difference in the loss of nitrogen compounds between vegetable coagulants and chymosin-like coagulants is due to the higher proteolytic activity of vegetable coagulants and is related to a lower cheese yield (Jacob et al., 2010). Comparing between vegetable coagulants, CC and CH presented higher losses of nitrogenous compounds than OP, in agreement with found in a previous investigation (Bande-De León et al., 2023), which demonstrated that OP presented lower proteolytic activity than CC and CH. Differences in the genotype and method of producing the CC and CV coagulants may explain the significant differences found in the loss of nitrogen compounds (Gomes et al., 2019).

3.4 Multivariate Analysis: Principal Component Analysis

Figure 5 shows the result of the reduction of variables by means of principal components based on the variables that were significant in the analysis of variance. A total of 86.3% of the variability among the different coagulants is explained by two components, PC1 and PC2, which correspond to 54.33% and 31.98% of variability, respectively.

The study of PC1 showed that vegetable coagulants were associated with negative values while commercial coagulants were related to the positive component. After a more detailed analysis of the results, three groups were established: on the one hand, CH and OP at the negative side of PC1 due to their higher losses of nitrogen compounds in the whey; secondly AR and FC at the positive side of PC1, due to the higher kinetic values obtained (G_{CFR} , G'_{CFR} and G'_F) and the better water retention of their curds (WHC); and in an intermediate situation CV and CC, with PC1 values close to zero.

Regarding PC2, it was related to the time intervals in which the kinetic curve is divided, with special impact on the vegetable coagulants (CV, CC, CH and OP). CH and CC grouped at the negative end of PC2 with higher time values in the secondary aggregation zone (t_{II}), and OP and CV grouped with positive PC2 values due to their longer onset (t_0) and primary aggregation (t_I) times. FC and AR showed an intermediate situation, with PC2 values that were positive but close to zero.

4. CONCLUSION

The optimum conditions of T, pH and [CaCl₂] of OP to maximize MCA in goat milk are (T = 36°C, pH = 6.5, [CaCl₂] = 6 mM). The coagulation kinetics of OP were similar to those demonstrated by CH and CC likewise, the losses of nitrogenous components after coagulation were lower than those of these vegetable coagulants commonly used for cheese production. These results demonstrate the potential of OP for its employability in the production of goat cheeses where extensive proteolysis is required. Studies reporting the physicochemical and sensory characteristics of goat cheeses produced with OP extracts are needed to confirm their validity.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work is supported by the Ministry of Economy, Industry and Competitiveness -through the Agencia Estatal de Investigación (AEI-MINECO, PCI2019-103551, Spain), and the Italian Ministry of Education, University and Research (MIUR, Italy) and is part of the PRIMA programme supported by the European Union. Project title: "Valorisation of thistle-curdled CHEESEs in MEDiterranean marginal areas" (<https://veggiemedcheeses.com/>).

REFERENCES

- Alavi, F., and S. Momen. 2020. Aspartic proteases from thistle flowers: traditional coagulants used in the modern cheese industry. *Int. Dairy J.* 107. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104709>
- Arango, O., A.J. Trujillo, and M. Castillo. 2015. Predicting coagulation and syneresis parameters of milk gels when inulin is added as fat substitute using infrared light backscatter. *J. Food Eng.* 157:63-69. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.02.021>

- Bande-De León, C., L. Buendía-Moreno, A. Abellán, P. Manzi, B. Al Mohandes Dridi, I. Essaidi, L. Aquilanti, and L. Tejada. 2023. Clotting and Proteolytic Activity of Freeze-Dried Crude Extracts Obtained from Wild Thistles *Cynara humilis* L. and *Onopordum platylepis* Murb. *Foods* 12:2325. <https://doi.org/10.3390/foods12122325>
- Ben Amira, A., A. Mokni, H. Yaich, M. Chaabouni, S. Besbes, C. Blecker, and H. Attia. 2017. Technological properties of milk gels produced by chymosin and wild cardoon rennet optimized by response surface methodology. *Food Chem.* 237:150-158. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.105>
- Brutti, C. B., M.F. Pardo, N.O. Caffini., and C.L. Natalucci. 2012. *Onopordum acanthium* L. (Asteraceae) flowers as coagulating agent for cheesemaking. *Lebensm. Wiss. Technol.* 45:172-179. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.09.001>.
- Castillo, M., F.A. Payne, C.L. Hicks, and M.B. Lopez. 2000. Predicting cutting and clotting time of coagulating goat's milk using diffuse reflectance: effect of pH, temperature and enzyme concentration. *Int. Dairy J.* 10:551-562. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(00\)00086-8](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(00)00086-8)
- Chazarra, S., L. Sidrach, D. López-Molina, and J.N. Rodríguez-López. 2007. Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus*, L.) flowers. *Int. Dairy J.* 17:1393-1400. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.04.010>

- Esteves, C. L. C., J. A. Lucey, D. B. Hyslop, and E. M. V. Pires. 2003a. Effect of gelation temperature on the properties of skim milk gels made from plant coagulants and chymosin. *Int. Dairy J.* 13:877–885. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00114-6](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00114-6)
- Esteves, C. L. C., J. A. Lucey, and E. M. V. Pires. 2002. Rheological properties of milk gels made with coagulants of plant origin and chymosin. *Int. Dairy J.* 12:427-434. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00170-4](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00170-4).
- Esteves, C. L. C., J. A. Lucey, T. Wang, and E. M. V. Pires. 2003b. Effect of pH on the gelation properties of skim milk gels made from plant coagulants and chymosin. *J. of Dairy Sci.* 86:2558–2567. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73850-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73850-8)
- Fernández-Salguero J., and E. Sanjuán. 1999. Influence of vegetable and animal rennet on proteolysis during ripening in ewe's milk cheese. *Food Chem.* 64:177-183. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00149-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00149-6)
- Foligni, R., C. Mannozi, M. Gasparrini, N. Raffaelli, F. Zamporlini, L. Tejada, C. Bande-De León, R. Orsini, P. Manzi, M.G. Di Costanzo, M. Ritota, L. Aquilanti, and M. Mozzon. 2022. Potentialities of aqueous extract from cultivated *Onopordum tauricum* (Willd.) as milk clotting agent for cheesemaking. *Food Res. Int.* 158. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111592>
- Frederiksen, P. D., K. K. Andersen, M. Hammershøj, H. D. Poulsen, J. Sørensen, M. Bakman, K. B. Qvist, and L. B. Larsen. 2011. Composition

and effect of blending of noncoagulating, poorly coagulating, and well-coagulating bovine milk from individual Danish Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 94:4787-4799. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4343>.

Gomes, S., A.T. Belo, N. Alvarenga, J. Días, P. Lage, C. Pinheiro, C. Pinto-Cruz, T. Brás, M.F. Duarte, and A.P.L. Martins. 2019. Characterization of *Cynara cardunculus* L. flower from Alentejo as a coagulant agent for cheesemaking. *Int. Dairy J.* 91:178-184. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.09.010>.

ISO/IDF (International Standards Organization/International Dairy Federation). 2007. Milk - Determination of total milk-clotting activity of bovine rennets. ISO 11815/IDF 157. International Dairy Federation,

Jacob, M., D. Jaros., and H. Rohm. 2010. The effect of coagulant type on yield and sensory properties of semihard cheese from laboratory-, pilot- and commercial-scale productions. *Int. J. Dairy Technol.* 63:370-380. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00598.x>

Mozzon, M., R. Foligni, C. Mannozi, F. Zamporlini, N. Raffaelli, and L. Aquilanti. 2020. Clotting properties of *Onopordum tauricum* (Willd.) aqueous extract in milk of different species. *Foods* 9:692. <https://doi.org/10.3390/foods9060692>

Muñoz, M., D. Fernández, J.M. Fresno, and D. Delgado. 2023. Effect of high hydrostatic pressure processing on the rennet coagulation kinetics and physicochemical properties of sheep milk rennet-induced gels. *J. Dairy Sci.* 106:2314-2325. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-21879>

- Nájera, A. I., M. de Renobales, and L. J. R. Barron. 2003. Effects of pH, temperature, CaCl₂ and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk: a multifactorial study. *Food Chem.* 80:345–352. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00270-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00270-4)
- Ordiales, E., A. Martín, M.J. Benito, S. Ruiz-Moyano, G. Gallardo, and M.D. Córdoba. 2016. Characterisation of the vegetable rennets used for 'Torta del Casar' cheesemaking by a protein profile method. *Int. J. of Dairy Technol.* 69:272-281. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12254>
- Rampanti, G., L. Belleggia, F. Cardinali, V. Milanović, A. Osimani, C. Garofalo, I. Ferrocino, and L. Aquilanti. 2023. Microbial dynamics of a specialty italian raw ewe's milk cheese curdled with extracts from spontaneous and cultivated *Onopordum tauricum* Willd. *Microorganisms* 11:219. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010219>
- Tamer, I.M. 1993. Identification and partial purification of a novel milk clotting enzyme from *Onopordum turcicum*. *Biotechnol. Lett.* 15:427-432. <https://doi.org/10.1007/BF00128289>.
- Tejada, L., A. Abellán, F. Prados, and JM. Cayuela. 2008. Compositional characteristics of Murcia al Vino goat's cheese made with calf rennet and plant coagulant. *Int. J. Dairy Technol.* 61:119-125. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2008.00396.x>
- Vianna, F. S., A. C. V. C. S. Canto, B. R. C. da Costa-Lima, A. P. A. A. Salim, M. P. Costa, C. F. Balthazar, B. R. Oliveira, R. P. Rachid, R. M. Franco, C. A. Conte-Junior, and A. C. O. Silva. 2017. Development of new

probiotic yoghurt with a mixture of cow and sheep milk: effects on physicochemical, textural and sensory analysis. *Small Rumin. Res.* 149:154–162. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.02.013>

Zikiou, A., and M.N. Zidoune. 2019. Enzymatic extract from flowers of Algerian spontaneous *Cynara cardunculus*: Milk-clotting properties and use in the manufacture of a Camembert-type cheese. *Int. J. of Dairy Technol.* 72:89–99. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12563>

Table 1. Chemical composition of raw milk samples from goats

Fat (g/100g)	Protein (g/100g)	Lactose (g/100g)	Total solids (g/100g)	Urea (mg/Kg)
3.52	3.22	4.40	11.93	650

Table 2. Dose of coagulants used

	Type of milk coagulant ¹					
	FC	AR	CC	CH	OP	CV
Dose (g/L)	0.12	0.21	0.26	0.51	3.50	0.13

¹FC = coagulant produced by fermentation, AR = commercial liquid animal rennet, CC = *Cynara cardunculus* L., CH = *Cynara humilis* L., OP = *Onopordum platylepis* Murb., CV = commercial vegetable coagulant from *Cynara cardunculus* L.

Table 3. Experimental design for the evaluation of the effect of T, pH and [CaCl₂] on the milk clotting activity of AR and plant coagulants CC, CH and OP

Run	Variables ¹			MCT ²			
	T	pH	[CaCl ₂]	AR	CC	CH	OP
1	33	5.5	6	46.5	123	154	779.5
2	36	5.5	2	53.5	75	118	1227.5
3	36	6.5	6	47	61.5	81.5	619.5
4	30	6	4	60.5	118	183	1556.5
5	33	6.5	4	58.5	145.5	208.5	1148
6	30	6.5	2	77	147.5	222.5	1849.5
7	30	5.5	6	49	121	155	986.5
8	33	6	2	63.5	179.5	218	1444
9	30	6.5	6	56	109.5	164	1105.5
10	36	5.5	6	36.5	57	84.5	674.5
11	36	6.5	2	54	96.5	116	992
12	30	5.5	2	64	193	221.5	1878

¹ T = temperature, [CaCl₂] = calcium chloride concentration

² Results are mean of two experiments expressed in seconds

Table 4. Regression coefficients and analysis of variance of response surface for the effect of T, pH, and [CaCl₂] on MCT

Term	AR			CC			CH			OP		
	Estimates	F Ratio	p-Value	Estimates	F Ratio	p-Value	Estimates	F Ratio	p-Value	Estimates	F Ratio	p-Value
Intercept	55.1969		<.0001*	138.125		<.0001*	193.2313		<.0001*	1201.95		<.0001*
Linear												
T	-6.9391	113.4743	<.0001*	-34.5	31.2444	<.0001*	-44.74688	550.0234	<.0001*	-288.7	853.6518	<.0001*
pH	3.6828	35.5651	<.0001*	-2	0.1168	0.7376	2.509375	1.9247	0.187	-26.35	7.9126	0.0138*
[CaCl ₂]	-7.3078	140.036	<.0001*	-22.25	14.4598	0.0019*	-26.00938	206.7685	<.0001*	-318.775	1158.042	<.0001*
Quadratic												
T x T	-2.1484	2.5652	0.1316	-49.625	15.2447	0.0016*	-49.95313	161.6454	<.0001*	62.25	9.359	0.0085*
pH x pH	0.1328	0.0061	0.9387	4.375	0.0742	0.7893	7.734375	2.4265	0.1416	-24	0.8711	0.3665
[CaCl ₂] x [CaCl ₂]	1.5078	0.7912	0.3888	14.125	0.7734	0.394	-6.265625	1.5924	0.2276	-73.125	8.0871	0.013*
Interactions												
T x pH	-1.125	2.9454	0.1082	10.375	2.7903	0.117	-1.875	0.9537	0.3454	-47.625	22.94	0.0003*
T x [CaCl ₂]	1.5	5.2362	0.0382*	7.125	1.316	0.2705	7.125	13.7709	0.0023*	88.75	79.6638	<.0001*
Ph x [CaCl ₂]	0.3719	0.3388	0.5698	3.375	191.842	0.586	2.13125	1.297	0.2739	40.1	17.1194	0.0041*

* Level of significance $p < 0.05$

Table 5. Polynomial model equation for the milk clotting time (MCT)

MCT	R ²	Adjusted R ²	F ratio	p Value*
<i>Animal rennet</i>				
-239.4313+(-17.1508)(CaCl ₂)+24.2531(pH)+16.9422(T)+0.3770(CaCl ₂) ² +0.5313(pH) ² +0.2387(T) ² +0.3719(CaCl ₂)(pH)+0.25(CaCl ₂)(T)+(-0.75)(pH)(T)	0.9602	0.9346	37.522	<0.0001
<i>Cynara cardunculus</i>				
-3124.75+(-98.8125)(CaCl ₂)+(-455.75)(pH)+306.1667(T)+3.5313(CaCl ₂) ² +17.5(pH) ² +(-5.5139(T) ² +3.375(CaCl ₂)(pH)+1.1875(CaCl ₂)(T)+6.9167(pH)(T)	0.8207	0.7055	7.1211	<0.0001
<i>Cynara humilis</i>				
-4287.8875+(-52.4484)(CaCl ₂)+(-333.5063)(pH)+354.1573(T)+(-1.5664)(CaCl ₂) ² +30.9375(pH) ² +(-5.5504)(T) ² +2.1313(CaCl ₂)(pH)+1.1875(CaCl ₂)(T)+(-1.25)(pH)(T)	0.9861	0.9772	110.4163	<0.0001
<i>Onopordum platylepis</i>				
5743.55+(-741.8625)(CaCl ₂)+1986.65(pH)+(-421.4)(T)+(-18.2813)(CaCl ₂) ² +(-96(Ph) ² +6.9167(T) ² +40.1(CaCl ₂)(pH)+14.7917(CaCl ₂)(T)+(-31.75)(pH)(T)	0.9944	0.9908	274.9716	<0.0001

*Level of significance p < 0.05.

Table 6. Optimum conditions

Milk coagulant	T	pH	[CaCl ₂]	Predicted MCT ¹	Desirability	Measured MCT ¹
AR	36	5.5	6	39.0125	0.863696	36.5
CC	36	5.5	6	45.625	0.988858	57
CH	36	6	6	73.3813	0.985842	77
OP	36	6.5	6	614.475	0.939395	619.5

¹Results are expressed in seconds.

Table 7. Effect of the type of coagulant on coagulation parameters in goat's milk

	MCA (IMCU/g)	RCT	CFR	G' _{CFR}	G' _F
FC	200.06±5.46 ^f	15.19±0.44 ^a	3.90±0.37 ^c	30.88±1.25 ^b	67.35±3.17 ^c
AR	115.78±3.03 ^d	15.02±0.32 ^a	3.69±0.35 ^c	28.51±2.10 ^b	64.35±4.02 ^{bc}
CC	91,63±1.38 ^c	15.03±0.23 ^a	3.78±0.19 ^c	27.12±0.71 ^b	61.03±2.26 ^b
CH	48.87±1.29 ^b	14.65±0.38 ^a	2.70±0.15 ^a	22.28±0.87 ^a	51.17±2.53 ^a
OP	7.34±0.35 ^a	14.33±0.80 ^a	2.85±0.23 ^a	23.24±0.82 ^a	48.15±3.56 ^a
CV	190.10±5.46 ^e	15.19±0.44 ^a	3.38±0.21 ^b	27.10±2.72 ^b	59.15±3.91 ^b

MCA: milk clotting activity, RCT = rennet coagulant time, CFR = curd firming rate, G'_{CFR} = static modulus value in CFR, G'_F = gel firmness after 30 min.

Results are mean of three experiments ± standard deviation (SD).

^{a-d} different superscript letters in a column mean significant differences at p < 0.05 (Tukey's test).

Table 8. Effect of the type of coagulant on kinetic time intervals of goat's milk gels

	t_0	t_I	t_{II}
FC	3.62±0.72 ^a	7.78±0.10 ^a	5.52±0.09 ^b
AR	3.59±0.39 ^a	7.89±0.10 ^a	5.22±0.10 ^{ab}
CC	3.13±0.07 ^a	7.50±0.28 ^a	5.27±0.09 ^{ab}
CH	3.26±0.07 ^a	8.09±0.18 ^{ab}	5.11±0.24 ^{ab}
OP	5.36±1.20 ^b	8.19±0.24 ^b	4.81±0.37 ^a
CV	4.00±0.29 ^{ab}	8.34±0.01 ^b	5.06±0.10 ^{ab}

t_0 = aggregation start time, t_I = primary aggregation time, t_{II} = secondary aggregation time

Results are mean expressed in minutes ± standard deviation (SD).

^{a-c} different superscript letters in a column mean significant differences at $p < 0.05$ (Tukey's test).

Table 9. Effect of the type of coagulant on the chemical composition of the whey and water-holding capacity (WHC) of goat's milk gels

	Whey composition			
	¹ WHC (%)	¹ Fat (%)	¹ Protein (%)	Urea (ppm)
FC	69.78±2.62 ^c	0.25±0.12 ^a	1.18±0.13 ^a	653±91 ^a
AR	65.74±1.65 ^{bc}	0.26±0.08 ^a	1.28±0.01 ^a	687±60 ^a
CC	44.14±2.46 ^a	0.28±0.10 ^a	1.86±0.11 ^c	1047±69 ^c
CH	42.11±1.87 ^a	0.28±0.10 ^a	1.71±0.05 ^c	952±40 ^c
OP	40.19±0.83 ^a	0.27±0.05 ^a	1.58±0.04 ^b	829±26 ^b
CV	62.16±3.82 ^b	0.25±0.05 ^a	1.43±0.07 ^b	785±47 ^b

¹Results are expressed as grams/100g of whey.

Results are mean ± standard deviation (SD).

^{a-e} different superscript letters in a column mean significant differences at $p < 0.05$ (Tukey's test).

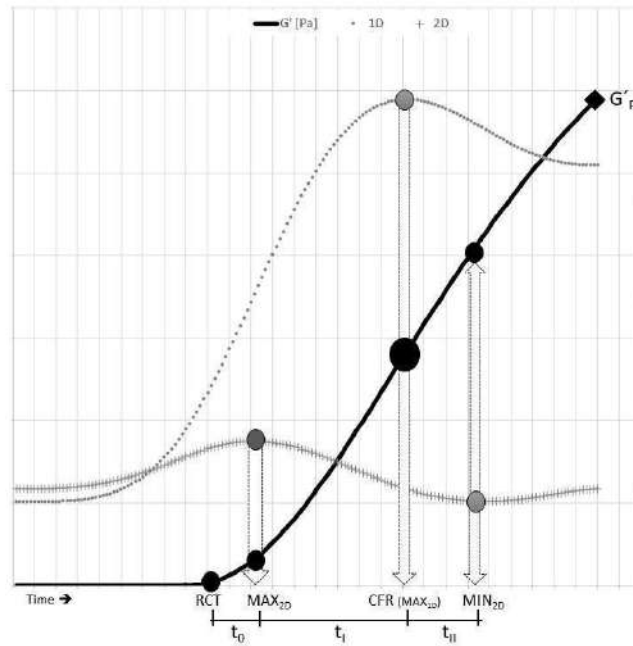
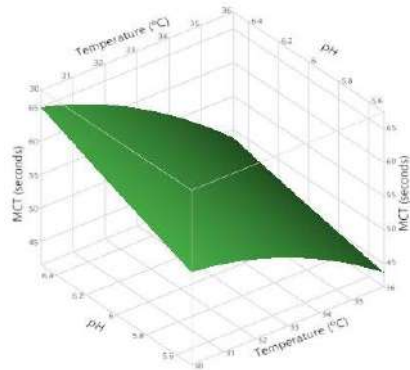
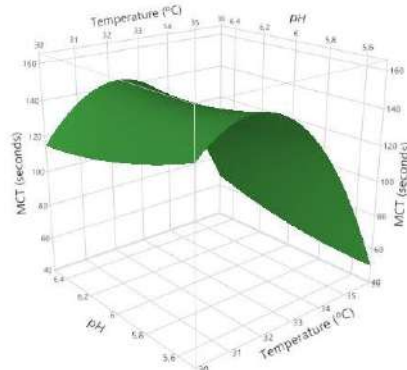


Figure 1. Representation of the coagulation kinetics by monitoring the elastic modulus (G') over time and calculating RCT, rennet clotting time; MAX_{2D} , maximum of the second derivative; $CFR_{(MAX_{1D})}$, curd firming rate; G'_F , elastic modulus after 40 minutes; t_0 , time to initiate aggregation; t_I , primary aggregation time; t_{II} , secondary aggregation time; and MIN_{2D} , minimum of the second derivative.

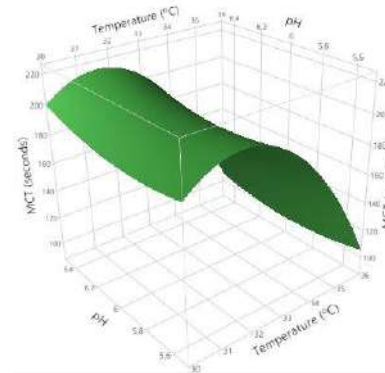
AR



CC



CH



OP

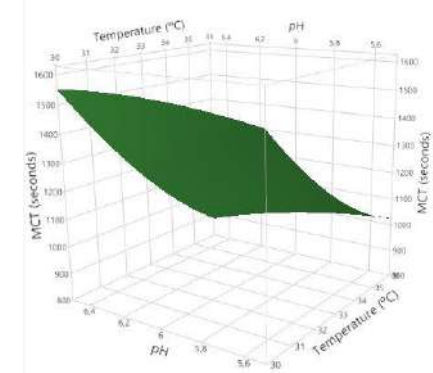
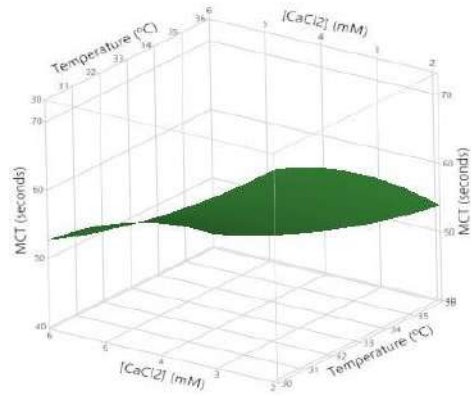
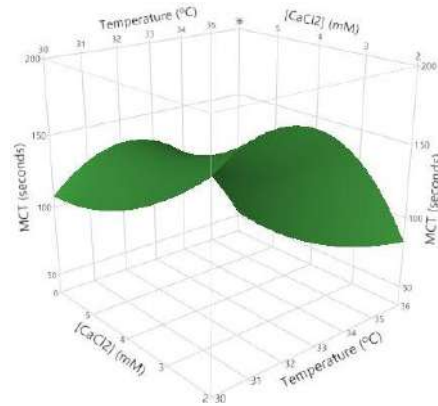


Figure 2. Response Surface plots for the effect of temperature (T) and pH on the milk clotting time (MCT) of animal rennet (AR), *Cynara cardunculus* L. (CC), *Cynara humilis* L. (CH), and *Onopordum platylepis* Murb. (OP), in goat's milk.

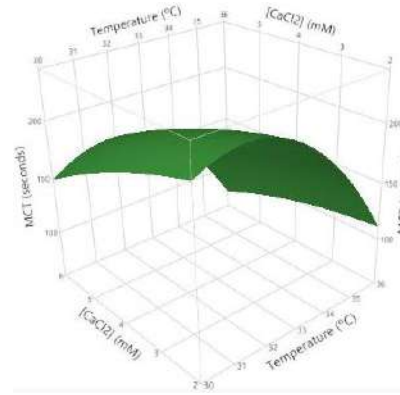
AR



CC



CH



OP

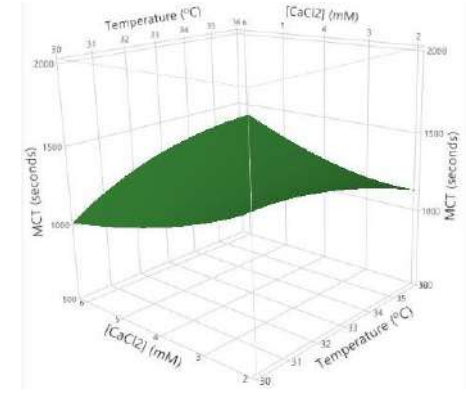
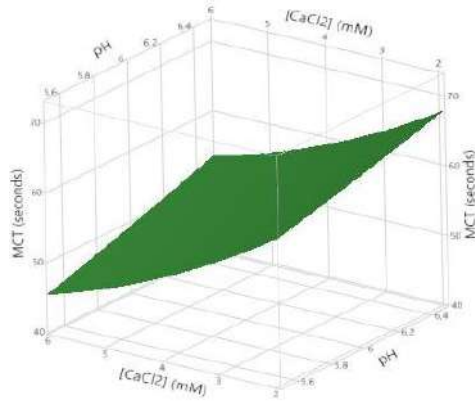
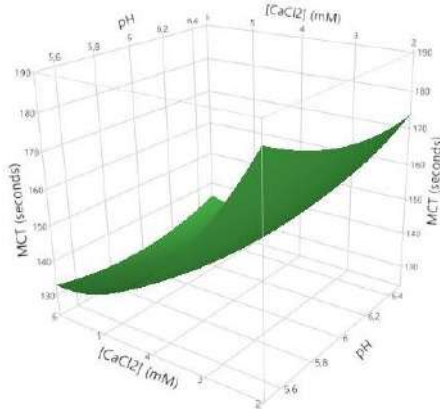


Figure 3. Response Surface plots for the effect of temperature (T) and calcium chloride concentration ($[CaCl_2]$) on the milk clotting time (MCT) of animal rennet (AR), *Cynara cardunculus* L. (CC), *Cynara humilis* L. (CH), and *Onopordum platylepis* Murb. (OP), in goat's milk.

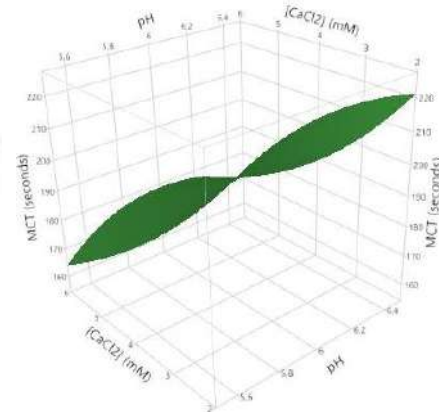
AR



CC



CH



OP

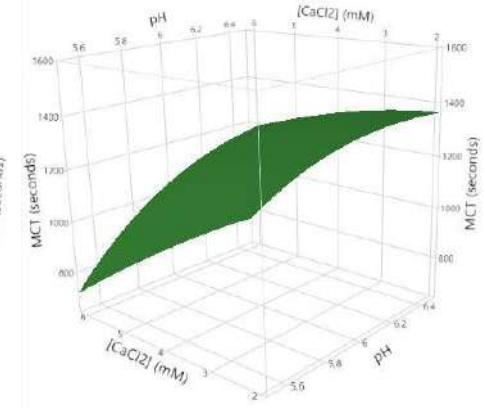


Figure 4. Response Surface plots for the effect of pH and calcium chloride concentration ($[CaCl_2]$) on the milk clotting time (MCT) of animal rennet (AR), *Cynara cardunculus* L. (CC), *Cynara humilis* L. (CH), and *Onopordum platylepis* Murb. (OP), in goat's milk.

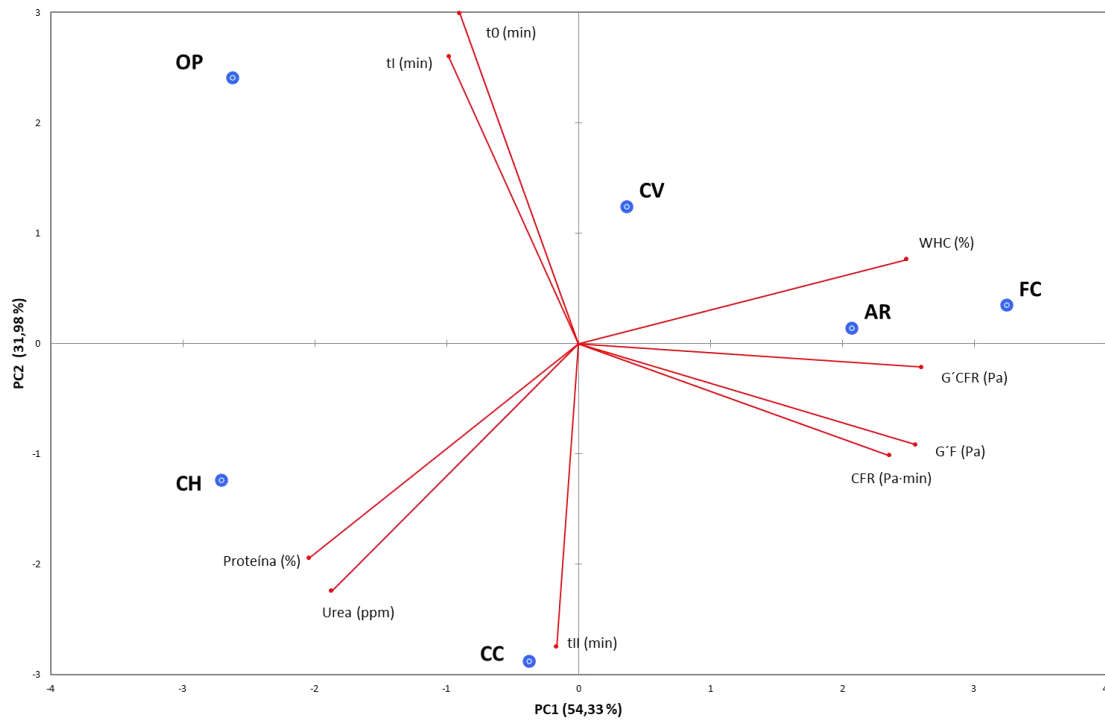


Figure 5. Principal component analysis biplot of the main components of whey composition and water holding capacity (WHC) of gels and coagulation kinetics characteristics evaluated in goat's milk using coagulant produced by fermentation (FC), animal rennet (AR), commercial vegetable coagulant (CV), *Cynara cardunculus* L. (CC), *Cynara humilis* L. (CH), and *Onopordum platylepis* Murb. (OP). CFR = curd firming rate; G'_{CFR} = value of elastic modulus in CFR; G'_F = elastic modulus after 40 minutes; t_0 : time to initiate aggregation; t_I : primary aggregation time; t_{II} : secondary aggregation time.

5.2. CAPÍTULO II. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS Y SENSORIALES DEL QUESO DE MURCIA AL VINO ELABORADO CON NUEVOS COAGULANTES VEGETALES.

En este capítulo se abordan los objetivos específicos 2, 3 y 4 para los que se elaboran quesos tipo “Murcia al vino” con varios tipos de coagulantes y se estudian sus efectos sobre sus características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales. También se evalúa la preferencia y aceptación de los quesos por parte de los consumidores. Este capítulo se compone de los siguientes artículos:

ARTÍCULO 5: Bande-De León, C., Salazar, E., Ritota, M., Rampanti, G., Zanolli, R., Aquilanti, L., & Tejada, L. **Influence of the type of coagulant on the compositional characteristics and sensory evaluation of goat’s cheese PDO “Murcia al vino”.** (En preparación).

5.2.1. Influence of the type of coagulant on the compositional characteristics and sensory evaluation of goat's cheese PDO "Murcia al vino".

Influence of the type of coagulant on the compositional characteristics and sensory evaluation of goat's cheese PDO "Murcia al vino"

C. Bande-De León^{a,*}, E. Salazar^a, M., Ritota^b, G. Rampanti^c, R. Zanolì^c, L. Aquilanti^c and L. Tejada^a

^a Department of Human Nutrition and Food Technology, Universidad Católica de Murcia-UCAM, Campus de los Jerónimos, 30107 Murcia, Spain

^b CREA, Centro di ricerca Alimenti e Nutrizione, Via Ardeatina 546, 00178 Rome, Italy

^c Department of Agricultural, Food and Environmental Sciences, Università Politecnica delle Marche, Via Brecce Bianche, 60131 Ancona, Italy

*Corresponding author: Cindy Bande-De León; Email: cmbande@ucam.edu; Tel.: +34 653264731

ABSTRACT

Murcia al vino cheese made using different type of coagulants were characterize by determine physicochemical, microbiological and sensory properties. The experimental coagulants elaborated from thistle flowers (CC and CH) and the mixture of animal rennet and vegetable coagulant (AR/OP) proved to be good substitutes for animal rennet in the production of Murcia al vino cheese. Cheeses made with the aqueous extract of *Cynara cardunculus* showed higher color intensity, elasticity, firmness, chewiness and microstructure; related to more intense proteolysis. Flavor spicity and persistency parameters were higher in cheeses made with 100% thistle flowers (COM, CC and CH), while the type of coagulant did not significantly affect the bitterness ($p > 0.05$). Consumers rated cheeses made with vegetable coagulant more highly once they had information on the type of coagulant.

Key Words: Murcia al vino, vegetable coagulant, goat cheese, consumer

1. INTRODUCTION

Milk production from small ruminants such as goats and sheep has been increasing significantly over time, and has doubled in the last 50 years. Goat and sheep milk has gained importance in the dairy industry and is used in the production of dairy foods included in the Mediterranean diet (Pulina, et al., 2018). According to 2021 data, Spain is the second largest producer of cheese in Europe, both sheep cheese (31%) and goat cheese (30%). At the national level, 12% of cheese production in 2021 corresponded to pure goat cheese, with a total of 6 varieties of pure goat cheese with Protected Designation of Origin (PDO): Murcia al vino, Murcia, Majorero, Palmero, Ibores, and Camerano. Specifically, Murcia al vino cheese constitutes 27.87% of the total production of pure goat cheese with PDO in Spain (MAPA, 2021; MAPA, 2022).

Murcia al vino cheese is made with pasteurized goat's milk from the Murciano-Granadina breed and coagulated with animal rennet, to which starter cultures are added. Although the regulations of the PDO Murcia al vino do not allow the use of any other type of coagulant for its production, in recent years, several studies have evaluated the applicability of vegetable coagulants from thistle flowers for its production (Tejada et al., 2006; Abellán et al., 2012b; García et al., 2014). The vegetable coagulant obtained from thistle flowers of the *Cynara cardunculus* species has been used since ancient times in cheesemaking and many PDO cheeses are made with this coagulant, mainly those made from raw sheep's milk in Portugal and Spain. However, the availability of this thistle can be limited and farmers are forced to use other species (e.g. *Cynara humilis*) to meet demand (Ordiales et al., 2016).

The effect of the coagulant obtained from *Cynara cardunculus* on the physicochemical and sensory properties of Murcia cheese and wine has already been evaluated (Tejada et al., 2006; García et al., 2014). Nevertheless, to date, the acceptance by a consumer panel has never been reported.

For the first time, Murcia al vino cheese was made with CH extract and a coagulant mixture of animal rennet and vegetable coagulant of *O. platylepis* (AR/OP). To this end, the aim of this work was to use vegetable coagulants from different thistle species to obtain vegetarian versions of PDO Murcia al vino cheese with differential organoleptic characteristics. For this reason, the effect of the different type of coagulant on physicochemical composition, microbial counts and sensory characteristics of the cheeses was assessed. This study also aimed to determine the influence of the coagulant information on the consumer acceptance of the cheese.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Biological material

Several types of milk coagulants were used to produce the cheeses: animal rennet (AR), commercial vegetable coagulant (COM), a coagulant mixture of animal rennet and freeze-dried extract from the species *Onopordum platylepis* Murb. (AR/OP), liquid crude vegetable coagulant from *Cynara cardunculus* (CC) and freeze-dried crude vegetable coagulants from *Cynara humilis* (CH). The commercial liquid animal rennet is from milking lamb (75 RU, Cuajos Caporal, Valladolid, Spain). The commercial liquid vegetable coagulant used is made from the thistle species *Cynara cardunculus* L. (1:15.000, Dairy and Food S.R.L., Bologna, Italy). The coagulant from the mixture of animal rennet and vegetable coagulant from the spontaneously growing *Onopordum platylepis* Murb. species was prepared by mixing 1.5mL of animal rennet with 50 mL

of *O. platylepis* freeze-dried extract reconstituted in water at a concentration of 20mg/mL. The liquid crude vegetable coagulant was prepared from dried thistle flowers of *Cynara cardunculus* L. species prepared by macerating 12 grams of crushed dried flowers in 100 mL of chloride-free mineral water.

Spontaneously grown flowers from the thistle species *Cynara cardunculus* L. (CC), *Cynara humilis* L. (CH), and *Onopordum platylepis* Murb. (OP) were collected. CH flowers were collected from Cáceres, Spain, and the OP flowers from Sousse, Tunisia. The freeze-dried extracts from CH and OP were prepared as described by Tejada and Fernández Salguero (2003), using a freeze-dryer Alpha 1-2LD plus (Christ, Osterode am Harz, Germany). The powdered extract obtained was frozen at -20°C until use.

The dosage of each of the coagulants added for cheese production is summarized in Table 1.

2.2 Cheesemaking and sampling:

Two batches of milk from different milking days were used to produce two lots of cheese with six pieces each, for a total of 12 cheese samples from each coagulant under study. The procedure specified in the Murcia al vino Protected Designation of Origin (PDO) regulations was followed (Abellán et al., 2012a). All the cheese samples weighed \pm 500g and were ripened for 30 days. All samples were transported to the laboratories under refrigerated conditions and kept at 4°C until analysis.

2.3 Physicochemical parameters

The pH of cheese samples was measured by a pH-meter (Hanna Instruments, Padova, Italy) equipped with a HI2031 solid electrode. Water activity (a_w) was

measured by an AwTherm apparatus (Rotronic, Bassersdorf, Switzerland) on approximately 5 g of grated cheese placed in the appropriate sample holder.

Dry matter, ash, protein and fat content (%) were determined as previously described by Abellán et al. (2012a). A LAQUAtwin salt-22 salinity meter (HORIBA, Ltd., Kyoto, Japan) was used for the measurement of the NaCl concentration (%). Lactose content was measured using the commercial Lactose Assay Kit (K-LOLAC) (Megazyme, Bray, Ireland) in accordance with the manufacturer's instructions.

Reported data on all the physicochemical parameters refer to the overall means \pm Standard Error ($n = 3$) of cheese samples obtained by each coagulant type.

2.4 Microbiological analyses

For the microbial viable counts, 10 g of each cheese sample were homogenized with 90 mL of sterile peptone water (bacteriological peptone, 1 g L⁻¹, Oxoid, Basingstoke, UK) with a stomacher apparatus (400 Circulator, International PBI, Milan, Italy) for 2 min at 260 rpm; aliquots of decimal dilutions of the homogenates were inoculated in duplicate on the opportune growth media for the enumeration of the following microbial groups (Cardinali et al., 2022): total mesophilic aerobes on Plate Count Agar (PCA) incubated at 30°C for 48 h; Pseudomonadaceae on Pseudomonas Agar Base (PAB) supplemented with Cetrimide, Fusidic Acid, and Cephaloridine (CFC), incubated at 30 °C for 48 h; Enterobacteriaceae on Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA) incubated at 37°C for 24 h; coliforms and Escherichia coli on Chromogenic Coliform Agar (CCA) incubated at 37°C for 24 h; yeasts and molds on Rose Bengal (RB) agar incubated at 25°C for 72 h; presumptive lactobacilli on de Man, Rogosa, Sharp (MRS) agar incubated at 30°C for 48 h; presumptive mesophilic and

thermophilic lactococci on M17 agar incubated at 22 and 45°C, respectively, for 48 h. The results were expressed as the Log of colony-forming units (cfu) per gram of each sample and reported as mean \pm standard deviation.

Each cheese sample was also tested for *Listeria monocytogenes* (UNE-EN ISO 11290-1:2018), *Salmonella* spp. (UNE-EN ISO 6579-1:2017/A1:2021) and Staphylococcal enterotoxins (A, B, C, D, E) (UNE-EN ISO 19020:2017) by enzyme-linked fluorescence assay (ELFA).

2.6 Sensory analyses

2.6.1 Instrumental color and texture profile analysis

For colour measurement cheeses samples were cut into three 1 cm thick slices and measurements of colour parameters were immediately read at about 10 points ($n = 10 \times 3$) of the sample surface with the reference illuminant D65 (standard daylight) and observer angle of 10°. Colour parameters in the CIE-LAB colour space, L^* (lightness, from 0% to 100%, dark to light), a^* (from -60 to 60, green to red) and b^* (from -60 to 60, blue to yellow) of the cheese samples were obtained by using a a Konica Minolta CM-400 spectrophotometer equipped with SpectraMagic NX VA.9 software (Konica Minolta, Osaka, Japan). The colour parameters C^* (Chroma) and h° (Hue angle) were calculated as follows $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$, $h^\circ = \arctan (b^* / a^*)$.

Texture profile analysis (TPA) was carried out as described by García et al. (2014) using a CT3-50K texture analyzer (Brookfield CNS Farnell, Borehamwood, UK). The procedure involved cutting cubed-shaped samples (3 cm³) from a rind-less cheese at refrigeration conditions (4–6 °C) and equilibrated for 30 min at room temperature (20 \pm 0.5 °C) before analysis. The TPA conditions were as follows: 20 °C room

temperature; 36mm diameter cylindrical flat probe; cross-head speed of 0.2 mm/s and 10 mm distance and a trigger point of 5.0 g. The texture variables, hardness (expressed as g), cohesiveness (adimensional), springiness (expressed as mm) and adhesiveness (expressed as mJ). Reported instrumental texture data refer to the overall means \pm Standard Error (n = 3) of cheese samples obtained by each coagulant type.

2.6.2 Quantitative-description analysis (QDA)

The sensorial characteristics were evaluated by 20 trained panellists, selected and trained by Queso de Murcia al Vino P.D.O. Regulatory Council in accordance with UNE-EN ISO 8586:2014 standard (AENOR, 2014). Sensorial evaluation sessions were carried out in a sensorial panel, equipped with individual cabins that complied with the UNE 87004 (AENOR, 1979).

A total of 28 sensory attributes were studied, 6 odor attributes (acidified milk, butter, goat, red wine, barn, and mouldy), 8 external appearance attributes (shape, edges, rind firmness, rind color, rind color homogeneity, horizontal marks, side marks, fissures and cracks), 3 internal appearance attributes (paste colour, paste colour homogeneity, number and size of the eyes), 4 texture attributes (springiness, firmness, chewiness and microstructure), 6 taste attributes (spicy, salty, acid, goat's milk, butter and bitter), and the persistency attribute (residual taste). A whole piece and a halved piece of each of the cheeses are exhibited to all the judges for the visual phase, where the shape, rind, colour of the paste and the number and distribution of the eyes are evaluated. To assess the rest of the organoleptic properties (smell, flavour, texture, residual taste), an olfactory-gustatory phase is carried out on the samples of each of the cheeses.

Cheese samples were stored at $\pm 15^{\circ}\text{C}$ for 2 h before analysis. They were prepared, as if for normal consumption, in ± 8 mm thick triangular slices, labelled using different numbers of three randomly selected digits and placed in a specific order. They were then placed on plastic trays in the testing area, together with a sensorial tasting questionnaire (score sheet), where a total of 28 descriptors were collected. The panelists scored the cheeses by a structured numerical rating scale from 0 (low intensity) to 10 (high intensity).

2.6.3 Consumer evaluation

The methodology proposed by Napolitano et al. (2010) Three tests were conducted over 2 days with a panel of non-trained consumers ($n = 100$). The first test consisted of a blind tasting of a cheese produced with COM and another with AR in a randomized order without information about the products (Perceived liking). In the second test, the subjects received information concerning the type of coagulant (animal or vegetable) and were asked to give their liking expectation for that product (Expected liking). Both tests were performed in the first day. The third test was performed three days after: the consumers were given vegetable coagulant cheese only, and after reading the information about the type of coagulant, they were asked to express their liking score (Actual liking).

2.7 Statistical Analysis

All data were analyzed by One-way analysis of variance (ANOVA) to assess the effect of the type of coagulant using the software package SPSS 21.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). The level for statistical significance was set at $p <$

0.05. To establish significant differences between groups, Tukey's LSD test was performed.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Effect of the type of coagulant on the physicochemical composition and viable counting

Table 2 shows the values of the physicochemical parameters evaluated in the cheeses elaborated with AR, COM, AR/OP, CC and CH. The values of pH, a_w , dry matter, protein and fat are similar to those found in various studies characterizing the properties of Murcia al vino cheeses made with animal rennet and vegetable coagulants (Tejada et al., 2008a; Abellán et al., 2012a; Boutoial et al., 2013).

As for pH, significant differences were found between the different types of coagulants, with cheeses made with AR and COM and the mixed coagulant (AR/OP) having a higher pH than those made with experimental coagulants (CC and CH). Tejada et al. (2008a) found no significant differences in pH after 30 days of ripening between cheeses made with vegetable coagulants and cheeses made with animal rennet, however, at longer ripening period, the pH of the cheeses curdled with vegetable coagulants was higher than in those with animal rennet, attributing to a greater proteolysis. The type of coagulant significantly affected ($p < 0.05$) the dry matter content of the cheeses, being higher in cheeses made with CC and CH. The lowest dry matter value was obtained in the cheese made with AR/OP. This result coincides with that reported by Tejada et al. (2008a), where at 30 days of ripening they found higher dry matter values in cheeses made with vegetable coagulants than in cheeses made with animal rennet. As for ash content, the effect of the type of coagulant was significant, with the cheese made with CH having the lowest ash content

compared to the cheeses made with AR and AR/OP. These results coincide with those reported by Tejada et al. (2008a), who found lower ash content in cheeses made with vegetable coagulant than in those made with animal rennet. Protein content was significantly affected by the type of coagulant used in cheese making, being higher in cheeses made with AR and COM and with AR/OP than in those made with the experimental coagulants CH and CC. In a study comparing Murcia al vino cheeses made with vegetable coagulant and animal rennet, no significant differences in protein content were found (Tejada et al., 2008a).

No significant differences were found in a_w , lactose, NaCl and fat parameters. The NaCl values found here are slightly lower than those found by Ferrandini et al. (2011) in Murcia al vino cheeses made with different types of animal rennet, and by Tejada et al. (2008) in Murcia al vino cheeses made with vegetable coagulant and animal rennet. The a_w values are similar to those reported by Boutoial et al. (2013) in Murcia al vino cheeses made with different types of animal rennet. Regarding fat content, Tejada et al. (2008a) didn't find significant differences in Murcia al vino cheeses made with vegetable coagulant and animal rennet, the fat content being higher in cheeses with vegetable coagulant than in those with animal rennet, coinciding with our results.

The results of viable counting are reported in Table 3. The type of coagulant was found to significantly affect the loads of Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae and yeasts; however, no significant differences were observed among the viable counts of cheese samples for the other microbial groups under investigation, thus excluding any influence of the rennet type on their loads.

A negative correlation was established between the growth of total mesophilic aerobes and presumptive mesophilic lactococci with the pH values, showing that cheeses made with CH had higher counts of these microbial groups and lower pH values. A higher lactococci load is related to the addition of lactic acid bacteria as starter cultures in the cheesemaking of Murcia al vino cheese and to a lower lactobacilli load, since the metabolism of the latter has a lower metabolic rate, limiting their capacity for biosynthesis (Morishita et al., 1981; Ferrazza et al., 2004; García et al., 2014). On the other hand, Rampanti et al. (2023) noted that lactic acid bacteria contribute to cheese flavor. The higher levels of Enterobacteriaceae and coliforms in cheeses made with AR and COM suggest that their use entails additional microbial contamination of initial milk (Vioque et al., 2000; Gómez et al., 2001; Tejada & Fernández-Salguero, 2003) and that freeze-drying of thistle extracts decreases the microbial load. However, Enterobacteriaceae belong to a very heterogeneous group and both negative effects (causing human infections) and biotechnological effects (starter cultures) have been found in cheese (Rampanti et al., 2023). The highest values of Pseudomonadaceae were found in cheeses made with aqueous coagulants COM and CC, which may be due to contamination caused mainly by factors intervening in the coagulant preparation or in the cheese production process. However, their identification deserves further analysis, since the results obtained from viable counting should be confirmed by DNA-based analysis (Rampanti et al., 2023). The lowest yeasts counts were found in the cheese samples made with CH; this can be attributed to the effect of freeze-drying on the reduction of the microbial load of the coagulant (Tejada et al., 2008b).

3.2 Effect of the type of coagulant on sensory analysis

Color measurements showed a significant effect of the rennet type on all chromatic coordinates except from lightness (L^*). Cheeses obtained by CH were characterised by higher (L^*), lower greenness (less negative a^* values) and higher yellowness (higher b^* values), whereas cheeses curdled with AR showed an opposite effect (Table 4). Moreover, cheeses curdled with CC, COM and AR/OP showed intermediate values. Similar trends were observed for the other two coordinates, C^* and h° , being the cheese made with CH the one that presented higher C^* values and lower h° values while the cheese made with AR showed the highest C^* value and the highest h° value (Table 4).

The results of the texture analysis are reported in Table 5. All the texture parameters measured showed significant differences ($p < 0.05$) between the different coagulants used. Cheeses produced with CC presented the lowest hardness values while those produced with COM presented the highest values ($p < 0.05$). These differences between two coagulants made from the same thistle species could be due to differences in genotype, production and method of obtaining the extract. On the other hand, cheeses with CH presented hardness values similar to those produced with animal rennet coagulants (AR and AR/OP). Hardness is negatively correlated with the proteolytic capacity of the extracts (Tejada et al., 2007) and the higher the proteolytic capacity of the extract, the lower the hardness of the cheese. Accordingly, Bande-De León et al. (2023) evaluated the caseinolytic capacity of freeze-dried extracts of CC, CH and OP, with CC being the extract with the highest proteolytic capacity on bovine casein.

Cohesiveness, springiness and adhesiveness values were similar to those demonstrated by García et al. (2014) in Murcia wine cheeses made with an aqueous

extract of *Cynara cardunculus*. Particularly, cheeses produced with CH presented higher values of springiness and adhesiveness, while cheeses produced with CC presented minimum values. The cheeses with AR/OP and AR presented intermediate values for both parameters. The opposite occurred with the cohesiveness parameter, for which cheeses with COM and CC presented higher values than cheeses with CH, AR/OP and AR.

3.3 Sensory analyses

3.3.1 *Trained panel sensory analysis*

Results concerning the Quantitative-description analysis of the cheeses are shown in Table 6.

Regarding the external attributes, all the cheeses showed an acceptable external appearance without cracks. Regarding rind shape, cheeses made with AR and AR/OP scored significantly higher ($p < 0.05$) than the rest, while the cheese with the lowest score was COM. As for rind firmness, CC and CH cheeses presented the lowest values ($p < 0.05$).

It can be seen how the type of coagulant significantly affected the attributes related to paste color. The color intensity was higher in cheeses made with COM and CC, while the lowest intensity was presented by AR and CH. The AR/OP cheese samples showed intermediate values of paste color intensity. This parameter has been related to increased proteolysis. (Tejada et al., 2007). In this sense, Bande-De León et al. (2023) reported a higher proteolytic activity of the CC extract compared to CH and OP on bovine caseins. However, it would be necessary to evaluate the proteolysis generated in cheese in order to establish a real correlation. AR cheeses have the

highest color homogeneity values, and AR/OP cheeses had the lowest scores for this parameter ($p < 0.05$).

Significant differences were found in the effect of coagulant type on cheese odor attributes ($p < 0.05$) except for the barni and mouldy attributes because there was no presence of these odor in any of the cheese samples. AR and CH cheeses presented the highest values of lactic and buttery odor attributes ($p < 0.05$). The enzymatic processes that occur during cheese making and ripening generate a large number of compounds that confer unique sensory characteristics to the cheese (Carbonell et al., 2002). Studies indicate that vegetable coagulants promote higher levels of amino acids as a result of more intense proteolysis (Abellán et al., 2012b). Buttery odor is related to fat metabolism and fatty acid formation, however, Tejada et al. (2008a) didn't find significant differences in the content of free fatty acids in Murcia al vino cheese samples prepared with animal rennet and vegetable coagulant. The highest goat attribute score was AR cheese ($p < 0.05$) and the cheeses with the highest wine attribute scores were AR and CH ($p < 0.05$). Volatile organic compound profiling of cheeses is needed to better understand the implications of coagulants on olfactory attributes.

Significant differences were found in the effect of coagulant type on all the cheese texture parameters evaluated ($p < 0.05$). The cheeses made with CC showed the lowest values for elasticity, firmness, chewiness and microstructure. In contrast, CH cheeses presented the highest values for firmness, chewiness and microstructure, although the elasticity scores were very similar to those of CC cheeses. Cheeses made with commercial coagulants, both vegetable and animal (AR and COM) presented values similar among them and higher than those of CC cheeses in all parameters.

Another study that evaluated the effect of animal rennet and a vegetable coagulant from *Cynara cardunculus* on the sensory characteristics of Murcia cheese with wine (Tejada et al, 2006) found that cheeses made with animal rennet had greater hardness and granularity and less creaminess than those made with the vegetable coagulant, attributing this result to the greater proteolysis of vegetable coagulants compared to animal rennet.

Regarding cheese flavor, significant differences ($p < 0.05$) were found between the type of coagulant in all parameters, except for bitterness. The attributes spicy, persistency and bitterness were higher in cheeses made with vegetable coagulants (COM, CC and CH), including the mixed coagulant (AR/OP), than in cheeses made with 100% animal rennet (AR). This trend is the similar in the case of the sour taste attribute, for which CC, CH and AR/OP cheeses showed higher levels of this flavor than AR cheeses; however, COM cheese received the lowest score for this parameter. For the flavor attributes goat's milk and butter, the same trend was found as in the odor attributes goat and buttery, respectively. According to Tejada et al. (2006), the intensity of flavor and bitter taste is related to proteolysis, being greater in cheeses made with vegetable coagulants. This result is in agreement with those herein reported.

3.3.2 *Consumer sensory acceptance*

Ratings given by consumers to AR and COM are summarised in Table 7. The mean consumer scores for perceived acceptability expressed in blind conditions were significantly higher for AR cheeses than for COM cheeses ($p < 0.05$). While for expected acceptability, no significant differences were found between the two types of cheeses ($p > 0.05$). In both the blind linking test and the expected liking test, consumer

scores were higher than 7 (slightly like) for AR cheese and higher than 6 (Neither like nor dislike) for COM cheese.

Results concerning the effect of information on blind and actual liking of COM cheeses are shown in Table 8. These results indicate that the effect of information changed the general acceptance of the cheese elaborated with COM being significantly lower ($p < 0.05$) the rating in the blind liking test than in the actual liking test after receiving information concerning the difference between animal rennet and vegetable coagulant. This result may be due to the fact that factors such as ethically sourced ingredients, social consciousness, and environmental considerations strongly contribute to the selection of food products, as well as the growing niche market of vegetarians and Kosher and Halal foods, which have increased interest in the search for plant-based coagulants to replace the use of animal rennet in cheese production. (Colombo et al., 2021). These results are consistent with previous studies confirming that aspects such as healthiness, naturalness, ethical aspects, etc., must be communicated to the consumer in order to affect the acceptability of the product as they cannot be perceived or experienced directly before or during consumption (Grunert et al., 2004).

4 CONCLUSIONS

The type of coagulant used influences the physicochemical composition, microbial counts, and sensorial parameters of the Murcia al vino cheeses. As expected, the experimental coagulants elaborated with thistle flowers from the species *Cynara humilis* and *Onopordum platylepis* in their various preparations were successful substitutes for animal rennet in the production of Murcia al vino

cheese. Cheeses made with the experimental vegetable coagulants presented higher dry matter content and flavor attributes related to higher proteolysis. Cheeses made with vegetable coagulant were widely accepted by consumers. Information on the coagulant used had a significant influence on the acceptance of the cheese.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work is supported by the Ministry of Economy, Industry and Competitiveness -through the Agencia Estatal de Investigación (AEI-MINECO, PCI2019-103551, España) and the Italian Ministry of Education, University and Research (MIUR) and is part of the PRIMA programme supported by the European Union. Project title: "Valorisation of thistle-curdled CHEESEs in MEDiterranean marginal areas" (<https://veggiemedcheeses.com/>).

REFERENCES

- Abellán, A., Cayuela, J.M., Pino, A., Martínez-Cachá, A., Salazar, E., and Tejada, L. 2012b. Free amino acid content of goat's milk cheese made with animal rennet and plant coagulant. *J. Sci. Food Agric.* 92:1657-1664. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5528>
- Abellán, A., Tejada L., Pérez-Garrido, A., Salazar, E., Martínez-Cachá, A., and Cayuela, J.M. 2012a. Effects of cheese size on composition and proteolysis in goat's milk cheese. *A. Alim.* 41:180-189. <https://doi.org/10.1556/AAlim.41.2012.2.5>

AENOR. 1979. Guide to installing a tasting room. UNE 87004 Spanish standard.

In "Sensory analysis. Methodology". pp. 57-64. AENOR: Madrid.

AENOR. 2014. Sensory Analysis – General guidelines for the selection, training and monitoring of selected assessors and expert sensory assessors (UNE-EN ISO 8586:2014). AENOR: Madrid

Bande-De León, C., Buendía-Moreno, L., Abellán, A., Manzi, P., Al Mohandes Dridi, B., Essaidi, I., Aquilanti, L., and Tejada, L. 2023. Clotting and Proteolytic Activity of Freeze-Dried Crude Extracts Obtained from Wild Thistles *Cynara humilis* L. and *Onopordum platylepis* Murb. *Foods* 12:2325. <https://doi.org/10.3390/foods12122325>

Boutoial, K., Ferrandini, E., Rovira, S., García, V., López, M.B. 2013. Effect of feeding goats with Rosemary (*Rosmarinus officinalis* spp.) by-product on milk and cheese properties. *Small Rumin. Res.* 112:147-153. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.12.002>

Carbonell, M., Nuñez, M., and Fernández-García, E. 2002. Evolution of the volatile components of ewe raw milk La Serena cheese during ripening. Correlation with flavour characteristics. *Lait* 82:683-698. <https://doi.org/10.1051/lait:2002042>

Cardinali, F., Foligni, R., Ferrocino, I., Harasym, J., Orkusz, A., Franciosa, I., Milanović, V., Garofalo, C., Mannozi, C., Mozzon, M., Cocolin, L., Osimani, A., Aquilanti, L. 2022. Microbial diversity, morpho-textural characterization, and volatilome profile of the Portuguese thistle-curdled cheese Queijo da

Beira Baixa PDO. Food Res. Int. 157.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111481>

Colombo, M.L., Cimino, C.V., Bruno, M.A., Hugo, A., Liggieri, C., Fernández, A., Vairo-Cavalli, S. 2021. Artichoke cv. Francés flower extract as a rennet substitute: effect on textural, microstructural, microbiological, antioxidant properties, and sensory acceptance of miniature cheeses. *J. Sci. Food Agric.* 101:1382-1388. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10749>

Ferrandini, E., López, M.B., Castillo, M., and Laencina, J. 2011. Influence of an artisanal Lamb rennet paste on proteolysis and textural properties of Murcia al Vino cheese. *Food Chem.* 124:583-588. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.079>

Ferrazza, R.E., Fresno, J.M., Ribeiro, J.I., Tornadijo, M.E., and Mansur, M. 2004. Changes in the microbial flora of Zamorano cheese (P.D.O.) by accelerated ripening process. *Food Res. Int.*, 37:149-155

García, V., Rovira, S., Boutuial, K., Ferrandini, E., and López Morales, M.B. 2014. Effect of starters and ripening time on the physicochemical, nitrogen fraction and textura profile of goat's cheese coagulated with a vegetable coagulant (*Cynara cardunculus*). *J. Sci. Food Agric.* 94:552-559. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6292>

Gómez, R., Sánchez, E., Vioque, M., Ferreira, J., Tejada, L., and Fernández-Salguero, J. 2001. Microbiological characteristics of ewe's milk cheese

manufactured using aqueous extracts of flowers from various species of cardoon *Cynara* L. *Milchwissenschaft* 56:16-19.

Grunert, K.G., Bredahl, L., and Brunso, K. 2004. Consumer perception of meat quality and implications for product development in the meat sector – a review. *Meat Sci.* 66:259-272. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(03\)00130-X](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(03)00130-X)

MAPA. 2022a. Caracterización del sector ovino y caprino de leche en España (Datos Año 2021). Accessed June 19, 2023. https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/caracterizacionovinoycaprinolechedatos2021_tcm30-562416.pdf

MAPA. 2022b. Datos de las Denominaciones de Origen Protegidas (D.O.P.), Indicaciones Geográficas Protegidas (I.G.P.) y Especialidades Tradicionales Garantizadas (E.T.G.) de Productos Agroalimentarios. Año 2021. Accessed June 19, 2023. https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/calidad-diferenciada/informedop_igp_2021_tcm30-626301.pdf

Morishita, T., Deguchi, Y., Yajima, M., Sakurai, T., and Yura, T. 1981. Multiple nutritional requirements of Lactobacilli: genetic lesions affecting amino acid biosynthetic pathways. *J. Bacteriol.* 148:64-71.

Napolitano, F., Braghieri, A., Piasentier, E., Favotto, S., Naspetti, S., and Zanolli, R. 2010. Cheese liking and consumer willingness to pay as affected by information about organic production. *J. Dairy Res.* 77:280-286. <https://doi.org/10.1017/S0022029910000130>

- Ordiales, E., Martín, A., Benito, M.J., Ruiz-Moyano, S., Gallardo, G., and Córdoba, M.D. 2016. Characterisation of the vegetable rennets used for 'Torta del Casar' cheesemaking by a protein profile method. *Int. J. of Dairy Technol.* 69:272-281. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12254>
- Pulina, G., Milán, M.J., Lavín, M.P., Theodoridis, A., Morin, E., Capote, J., Thomas, D.L., Francesconi, A.H.D., and Caja, G. 2018. Invited review: Current production trends, farm structures, and economics of the dairy sheep and goat sectors. *J. Dairy Sci.* 101:6715-6729. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14015>
- Rampanti, G., Belleggia, L., Cardinali, F., Milanović, V., Osimani, A., Garofalo, C., Ferrocino, I., and Aquilanti, L. 2023. Microbial dynamics of a specialty italian raw ewe's milk cheese curdled with extracts from spontaneous and cultivated *Onopordum tauricum* Willd. *Microorganisms* 11:219. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010219>
- Spanish Association for Standarization. 2018. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp. Part 1: Detection method. (UNE-EN ISO 11290-1:2017). UNE: Madrid.
- Spanish Association for Standarization. 2018. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the immunoenzymatic detection of staphylococcal enterotoxins in foodstuffs. (UNE-EN ISO 19020:2017). UNE: Madrid.
- Spanish Association for Standarization. 2021. Microbiology of the food chain- Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of

Salmonella - Part 1: Detection of Salmonella spp. – Amendment 1 Broader range of incubation temperatures, amendment to the status of Annex D, and correction of the composition of MSRV and SC. (UNE-EN ISO 6579-1:2017/A1:2021). UNE: Madrid.

Tejada, L., Abellán, A., Cayuela, J.M., Martínez-Cachá, A. 2006. Sensorial characteristics during ripening of the Murcia al vino goat's milk cheese: the effect of the type of coagulant used and the size of the cheese. *J. Sens Stud.* 21:333-347. <https://doi.org/10.1111/j.1745-459X.2006.00069.x>

Tejada, L., Abellán, A., Prados, F., Cayuela, J.M. 2008a. Compositional characteristics of Murcia al Vino goat's cheese made with calf rennet and plant coagulant. *Int. J. Dairy Technol.* 61:119-125. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2008.00396.x>

Tejada, L., and Fernández-Salguero, J. 2003. Chemical and microbiological characteristics of ewe milk cheese (Los Pedroches) made with a powdered vegetable coagulant or calf rennet. *Ital. J. Food Sci.* 15:125-131.

Tejada, L., Gómez, R., and Fernández-Salguero, J. 2007. Sensory characteristics of ewe milk cheese made with three types of coagulant: calf rennet, powdered vegetable coagulant and crude aqueous extract from *Cynara cardunculus*. *J. Food Qual.* 30:91-103. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2007.00108.x>

Tejada, L., Vioque, M., Gómez, R., and Fernández-Salguero, J. 2008b. Effect of lyophilisation, refrigerated storage and frozen storage on the coagulant activity

and microbiological quality of *Cynara cardunculus* L. extracts. J. Sci. Food Agric. 88:1301–1306. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3193>

Vioque, M., Gómez, R., Sánchez, E., Mata, C., Tejada, L., and Fernández-Salguero, J. 2000. Chemical and microbiological characteristics of ewes' milk cheese manufactured with extracts from flowers of *Cynara cardunculus* and *Cynara humilis* as coagulants. J. Agric. Food Chem. 48:451-456. <https://doi.org/10.1021/jf990326v>

Table 1. Dose of coagulants used

	Type of milk coagulant				
	AR ²	COM ²	AR/OP ²	CC ²	CH ¹
Dose	4.0	0.35	51.5	100	0.28

AR = commercial liquid animal rennet, COM = commercial vegetable coagulant from *Cynara cardunculus* L., AR/OP = mixture of animal rennet and freeze-dried extract from the species *Onopordum platylepis* Murb., CC = *Cynara cardunculus* L., CH = *Cynara humilis* L.

¹grams of freeze-dried extract per L of milk

²ml of coagulant per L of milk

Table 2. Effect of coagulant type on the physicochemical characteristics of Murcia al vino cheese

	AR	COM	AR/OP	CC	CH	p-Value
pH	5.25±0.02 ^{bc}	5.26±0.03 ^b	5.23±0.07 ^{bc}	5.14±0.04 ^{ac}	5.09±0.01 ^a	0.0129
a _w	0.95±0.00 ^a	0.95±0.00 ^a	0.94±0.00 ^a	0.94±0.00 ^a	0.95±0.00 ^a	0.2868
Lactose ¹	0.75±0.09 ^b	0.22±0.21 ^a	0.60±0.05 ^{ab}	0.38±0.04 ^{ab}	0.73±0.02 ^b	0.1292
NaCl ¹	1.45±0.06 ^a	1.28±0.08 ^{ab}	1.37±0.10 ^{ab}	1.20±0.08 ^b	1.30±0.04 ^{ab}	0.2109
Dry matter ¹	61.22±1.49 ^c	61.84±0.53 ^c	57.92±0.24 ^b	63.21±0.68 ^{ac}	65.19±1.09 ^a	0.0000
Ash ²	6.03±0.18 ^a	5.92±0.22 ^a	6.04±0.24 ^a	5.70±0.18 ^a	5.05±0.03 ^b	0.0042
Fat ²	42.85±9.74 ^a	38.74±3.26 ^a	48.88±2.72 ^a	44.32±5.07 ^a	48.56±1.96 ^a	0.2089
Protein ²	39.26±0.93 ^a	36.78±1.59 ^{ab}	38.60±2.97 ^a	33.75±0.71 ^b	32.72±0.13 ^b	0.0328

¹Expressed as grams per 100g of cheese

²Expressed as grams per 100g of dry matter.

Results are expressed as mean ± standard error of mean (SEM). ^{a-c} different superscript letters in a row mean significant differences (LSD test, P < 0.05). AR = commercial liquid animal rennet, COM = commercial vegetable coagulant from *Cynara cardunculus* L., AR/OP = mixture of animal rennet and freeze-dried extract from the species *Onopordum platylepis* Murb., CC = *Cynara cardunculus* L., CH = *Cynara humilis* L.

Table 3. Viable counts of cheeses samples expressed as Log cfu g⁻¹

	AR	COM	AR/OP	CC	CH	p-value
Total mesophilic aerobes	8.68±0.48 ^a	8.95±0.03 ^a	8.59±0.77 ^a	8.82±0.17 ^a	9.07±0.40 ^a	0.5616
Presumptive lactobacilli	8.58±0.32 ^a	8.73±0.11 ^a	8.61±0.34 ^a	8.62±0.11 ^a	7.53±1.26 ^b	0.0696
Presumptive lactococci	8.57±0.51 ^a	8.88±0.09 ^a	8.67±0.27 ^a	8.67±0.08 ^a	9.01±0.40 ^a	0.3081
Presumptive thermophilic lactococci	8.52±0.40 ^a	8.62±0.15 ^a	8.31±0.30 ^a	8.47±0.23 ^a	8.59±0.31 ^a	0.6050
Pseudomonadaceae	2.54±0.53 ^b	4.40±1.01 ^a	3.15±0.28 ^{bc}	4.20±0.24 ^a	3.57±0.55 ^{ac}	0.0028
Enterobacteriaceae	2.90±0.23 ^{ab}	4.05±1.22 ^a	1.92±0.99 ^{bc}	0.93±0.05 ^{ab}	1.79±1.02 ^c	0.0011
Coliforms	4.08±0.07 ^{ab}	4.74±0.93 ^b	3.92±0.71 ^{ab}	3.19±2.64 ^{ab}	2.11±1.39 ^a	0.1527
<i>E. coli</i>	< 1.0 ^a	1.19±0.93 ^a	< 1.0 ^a	< 1.0 ^a	< 1.0 ^a	0.8203
Molds	1.40±0.58 ^a	2.17±0.82 ^a	1.51±0.70 ^a	1.49±0.68 ^a	2.06±0.41 ^a	0.3513
Yeasts	3.37±0.58 ^a	3.21±0.42 ^a	4.05±0.79 ^a	3.23±0.27 ^a	1.95±1.21 ^b	0.0159

Results are expressed as mean ± standard error of mean (SEM). ^{a-c} different superscript letters in a row mean significant differences (LSD test, P < 0.05). AR = commercial liquid animal rennet, COM = commercial vegetable coagulant from *Cynara cardunculus* L., AR/OP = mixture of animal rennet and freeze-dried extract from the species *Onopordum platylepis* Murb., CC = *Cynara cardunculus* L., CH = *Cynara humilis* L.

Table 4. Effect of coagulant type on the texture profile of Murcia al vino cheese

	AR	COM	AR/OP	CC	CH	p-Value ¹
Hardness	2253±33.74 ^c	3069.42±380.15 ^a	2038.08±157.11 ^c	1287.58±32.27 ^b	2495.83±90.80 ^c	0.0000
Cohesiveness	0.32±0.04 ^b	0.49±0.05 ^a	0.27±0.04 ^b	0.44±0.03 ^a	0.27±0.04 ^b	0.0005
Springiness	7.22±0.16 ^{ab}	6.72±0.23 ^{bc}	6.38±0.12 ^{bc}	6.02±0.23 ^c	8.05±0.57 ^a	0.0008
Adhesiveness	0.69±0.11 ^{bc}	0.65±0.05 ^{bc}	1.24±0.12 ^b	0.59±0.04 ^c	2.44±0.46 ^a	0.0000

Results are expressed as mean ± standard error of mean (SEM). ^{a-c} different superscript letters in a row mean significant differences (LSD test, P < 0.05). AR = commercial liquid animal rennet, COM = commercial vegetable coagulant from *Cynara cardunculus* L., AR/OP = mixture of animal rennet and freeze-dried extract from the species *Onopordum platylepis* Murb., CC = *Cynara cardunculus* L., CH = *Cynara humilis* L.

Table 5. Effect of coagulant type on the instrumental color profile of Murcia al vino cheese

	AR	COM	AR/OP	CC	CH
L*	86.94 ^a	85.41 ^a	86.76 ^a	85.98 ^a	87.36 ^a
a*	-1.65 ^b	-1.70 ^b	-1.37 ^a	-1.28 ^a	-0.67 ^c
b*	8.44 ^b	9.13 ^a	9.10 ^a	9.45 ^a	11.89 ^c
C*	8.61 ^b	9.29 ^a	9.21 ^a	9.54 ^a	11.91 ^c
h°	101.23 ^a	100.51 ^a	98.53 ^b	97.64 ^c	93.22 ^d

Results are expressed as mean \pm standard error of mean (SEM). ^{a-c} different superscript letters in a row mean significant differences (LSD test, P < 0.05). AR = commercial liquid animal rennet, COM = commercial vegetable coagulant from *Cynara cardunculus* L., AR/OP = mixture of animal rennet and freeze-dried extract from the species *Onopordum platylepis* Murb., CC = *Cynara cardunculus* L., CH = *Cynara humilis* L.

Table 6. Effect of the type of coagulant on the sensory characteristics of the Murcia al vino cheese

Sensory attributes	AR	COM	AR/OP	CC	CH	p-Value ¹
External attributes (Rind)						
Shape	7.90±0.13 ^a	6.80±0.24 ^c	7.80±0.16 ^a	7.20±0.14 ^{bc}	7.30±0.13 ^b	0.0000
Straight edges	5.20±0.12 ^a	5.70±0.13 ^d	6.20±0.12 ^{bc}	5.90±0.21 ^{cd}	6.50±0.18 ^b	0.0000
Firmness	6.40±0.11 ^c	6.30±0.13 ^c	6.00±0.14 ^{ac}	5.50±0.22 ^b	5.60±0.18 ^{ab}	0.0001
Color	7.50±0.23 ^c	7.40±0.25 ^c	6.50±0.15 ^b	7.60±0.13 ^c	8.80±0.12 ^a	0.0000
Color homogeneity	8.00±0.14 ^d	6.00±0.41 ^b	5.10±0.20 ^c	6.70±0.19 ^a	8.40±0.18 ^d	0.0000
Marks on the horizontal side	2.70±0.18 ^a	4.60±0.24 ^b	4.50±0.24 ^b	4.70±0.29 ^b	2.80±0.21 ^a	0.0000
Marks on the lateral side	0.60±0.13 ^b	1.30±0.18 ^c	1.80±0.20 ^a	1.20±0.14 ^c	1.20±0.12 ^c	0.0000
Fissures and cracks	0±0 ^a	0±0 ^a	0±0 ^a	0.10±0.05 ^b	0±0 ^a	0.0022
Paste attributes						
Color	2.80±0.17 ^a	3.40±0.16 ^b	3.10±0.13 ^{ab}	3.30±0.14 ^b	3.00±0.12 ^{ab}	0.0384
Color homogeneity	9.10±0.09 ^a	8.10±0.21 ^c	8.00±0.12 ^c	8.30±0.10 ^{bc}	8.60±0.13 ^b	0.0000
Fissures, cracks and eyes	0±0 ^a	0±0 ^a	0±0 ^a	0±0 ^a	0±0 ^a	ns
Odor attributes						
Lactic	4.70±0.28 ^a	4.10±0.21 ^c	3.50±0.18 ^b	4.00±0.18 ^{bc}	4.50±0.22 ^{ac}	0.0012
Buttery	3.50±0.16 ^c	3.40±0.18 ^{ac}	3.00±0.14 ^{ab}	2.90±0.15 ^b	3.70±0.10 ^c	0.0006
Goat	4.00±0.16 ^a	3.40±0.15 ^{bc}	3.30±0.14 ^c	3.70±0.10 ^{ab}	3.40±0.15 ^{bc}	0.0030
Red Wine	4.70±0.18 ^b	3.90±0.22 ^c	3.20±0.16 ^a	3.80±0.24 ^c	5.00±0.16 ^b	0.0000
Barny	0±0 ^a	0±0 ^a	0±0 ^a	0±0 ^a	0±0 ^a	ns
Mouldy	0±0 ^a	0±0 ^a	0±0 ^a	0±0 ^a	0±0 ^a	ns
Texture attributes						
Elasticity	3.80±0.12 ^{ab}	3.80±0.16 ^{ab}	4.20±0.20 ^a	3.30±0.19 ^b	3.50±0.23 ^b	0.0089
Firmness	3.80±0.14 ^{bc}	3.80±0.12 ^{bc}	3.50±0.22 ^c	2.40±0.11 ^a	4.00±0.16 ^b	0.0000
Chewiness	2.60±0.11 ^c	2.90±0.09 ^c	3.00±0.16 ^c	2.00±0.12 ^b	3.90±0.21 ^a	0.0000
Microstructure	2.00±0.10 ^a	2.50±0.11 ^b	2.00±0.12 ^a	1.80±0.10 ^a	2.80±0.16 ^b	0.0000
Flavor attributes						
Spicy	1.10±0.11 ^c	2.00±0.14 ^a	1.30±0.13 ^c	1.80±0.19 ^{ab}	1.40±0.15 ^{bc}	0.0001
Salty	3.40±0.15 ^{abc}	3.60±0.13 ^{ab}	3.70±0.16 ^a	3.30±0.07 ^{cd}	3.10±0.13 ^d	0.0125
Sour taste	4.80±0.17 ^{ab}	4.60±0.21 ^b	5.80±0.21 ^c	5.30±0.20 ^{ac}	5.80±0.24 ^c	0.0000

Goat's milk	3.60±0.11 ^b	3.00±0.16 ^a	3.30±0.19 ^{ab}	3.60±0.18 ^b	3.20±0.10 ^{ab}	0.0203
Butter	3.10±0.19 ^a	2.60±0.13 ^{bc}	2.50±0.13 ^{bc}	2.20±0.12 ^c	2.90±0.19 ^{ab}	0.0004
Bitterness	2.10±0.17 ^b	2.40±0.21 ^{ab}	2.60±0.23 ^{ab}	3.00±0.25 ^a	2.70±0.24 ^{ab}	0.0557
Persistency	5.30±0.14 ^a	6.10±0.13 ^{bc}	5.80±0.10 ^c	6.20±0.10 ^b	5.80±0.17 ^c	0.0000

Results are expressed as mean ± standard error of mean (SEM). ^{a-c} different superscript letters in a row mean significant differences (LSD test, P < 0.05). AR = commercial liquid animal rennet, COM = commercial vegetable coagulant from *Cynara cardunculus* L., AR/OP = mixture of animal rennet and freeze-dried extract from the species *Onopordum platylepis* Murb., CC = *Cynara cardunculus* L., CH = *Cynara humilis* L.

Table 7. Rating given by the consumer panel during the three hedonic tests

Type of rating	AR	COM	p-value
Perceived Liking	7.33±0.14a	6.41±0.18b	0.0001
Expected Liking	7.18±0.16a	6.91±0.17a	0.2415
Actual Liking	-	6.96±0.14	

Results are expressed as mean ± standard error of mean (SEM). ^{a-c} different superscript letters in a row mean significant differences (LSD test, P < 0.05). AR: animal rennet; COM: commercial vegetable coagulant.

Table 8. Effect of information on consumer acceptance of cheese

Type of coagulant	Perceived Liking	Actual Liking	p-value
COM	6.41±0.18a	6.96±0.14b	0.0180

Results are expressed as mean ± standard error of mean (SEM). ^{a-c} different superscript letters in a row mean significant differences (LSD test, P < 0.05). COM: commercial vegetable coagulant.

5.3. CAPÍTULO III. EVALUACIÓN DE LA PROTEÓLISIS DEL QUESO MURCIA AL VINO ELABORADO CON NUEVOS COAGULANTES VEGETALES.

Los objetivos 3 y 5 se abordan en este capítulo en el que se evalúa el efecto del tipo de coagulante sobre la proteólisis de los quesos tipo “Murcia al vino”. También se estudia la bioactividad de los péptidos de los hidrolizados de caseína bovina elaborados con los extractos de *Cynara cardunculus*, *Cynara humilis* y *Onopordum platylepis*. Este capítulo se compone de los siguientes artículos:

ARTÍCULO 6: Bande-De León, C., Hernández-Correas, N., Bueno-Gavilá, E., Aquilanti, L., & Tejada, L. **Effect of the type of coagulant on the proteolysis of PDO goat cheese “Murcia al vino” and casein hydrolysates bioactivity.** (En preparación).

5.3.1. Effect of the type of coagulant on the proteolysis of PDO goat cheese “Murcia al vino” and casein hydrolysates bioactivity

Effect of the type of coagulant on the proteolysis of goat's cheese PDO "Murcia al vino" and casein hydrolysates bioactivity

C. Bande-De León^{a,*}, N. Hernández-Correas^a, E. Bueno-Gavilá^a, L. Aquilanti^b and L. Tejada^a

^a Department of Human Nutrition and Food Technology, Universidad Católica de Murcia-UCAM, Campus de los Jerónimos, 30107 Murcia, Spain

^b Departament of Agricultural, Food and Environmental Sciences, Università Politecnica delle Marche, Via Brecce Bianche, 60131 Ancona, Italy

*Corresponding author: Cindy Bande-De León; Email: cmbande@ucam.edu; Tel.: +34 653264731

ABSTRACT

Murcia al vino type cheeses were made with different extracts obtained from *Cynara cardunculus* L. (CC), *Cynara humilis* L. (CH) and *Onopordum platylepis* Murb. (OP), a coagulant mixture of animal rennet and *Onopordum platylepis* Murb. (AR/OP), a commercial vegetable coagulant from *Cynara cardunculus* L. (COM) and animal rennet (AR), to determine the effect of coagulant type on cheese proteolysis. Significant differences were found between species in the different proteolysis parameters evaluated. Cheeses made with thistle flower-based vegetable coagulants showed higher values of WSN, NPN, and hydrophobic peptides than those made with animal rennet and mixed coagulant, with the cheese made with OP showing the highest values. The free amino acid content did not show a specific pattern, however, the values of the amino acids tyr and trp, related to higher proteolysis, were significantly higher in cheeses made with CC and COM.

The plant extracts of CC, CH, and OP were used to obtain bovine casein hydrolysates and determine the bioactivity of their peptides. After identifying the peptide sequences, a total of 20, 15, and 5 peptide sequences in the hydrolysates of CH, CC, and OP, respectively, were found to be in their bioactive form and have been reported to present activities as angiotensin-I converting enzyme inhibitory, antioxidative, antibacterial, antiviral, haemolytic, among others.

Key Words: Murcia al vino, vegetable coagulant, cheese, proteolysis, bioactive peptides

1. INTRODUCTION

During cheese ripening, several biochemical processes occur, but proteolysis is the most complex and important for most cheese varieties as it strongly contributes to the development of cheese sensory characteristics such as texture, aroma and flavor (Saldo et al., 2002; Sánchez et al., 2001; Tejada et al., 2008b). The breakdown of the protein network and hydrolysis of the caseins produces peptides of different molecular masses and releases free amino acids. These peptides are then degraded by the coagulant and by enzymes from the cheese microflora. The released amino acids are involved in secondary catabolic reactions, in which they act as precursors giving rise to volatile compounds and sapid compounds (Abellán et al., 2012a; Saldo et al., 2002). Regarding peptides, it has been observed that hydrophobic peptides (Ho) have a higher amount of bioactivity (Bueno-Gavilá et al., 2019).

It is well known that a balance in proteolysis is of great importance in order not to generate undesired effects in the cheese, since an excess of proteolysis during cheesemaking leads to an accumulation of small peptides of low molecular

weight and hydrophobic peptides (Ho) of intermediate size related to a lower cheese yield and enhance the bitter taste (Saldo et al., 2002; Mazorra-Manzano et al., 2013). However, in some varieties of cheese, the bitter taste is not considered a defect, but a distinctive character (Tejada et al., 2008a). Proteolysis is not affected by a single factor; the type of coagulant, the ripening conditions and the variety of cheese have a major influence on this process (Sánchez et al., 2001). Because of this complexity, proteolysis must be measured with various rates, such as cheese nitrogen fractions, hydrophilic (Hi) and hydrophobic (Ho) peptide profile and the ratio of hydrophobic to hydrophilic (Ho/Hi) peptide by chromatography and quantification of free amino acids in cheese (Saldo et al., 2002; Tejada et al., 2008a).

The effect of vegetable coagulants on the proteolysis of sheep and goat cheeses has been previously evaluated using various indicators (Tejada et al., 2008a; Fernández-Salguero et al., 2002; Abellán et al., 2012b), and the results show that there is greater proteolysis of caseins during and after ripening in cheeses made with thistle flower vegetable coagulant than in those made with animal rennet. Thistle flowers have been used for many years as coagulating agents in the production of traditional cheeses and cheeses with quality standards such as the Protected Designation of Origin in which a greater proteolysis is desired to achieve a creamier texture and a unique flavor and aroma (Fernández-Salguero et al., 2002). Its use has also been evaluated in the production of protein hydrolysates with a high content of bioactive peptides (Tejada et al., 2022; Bueno-Gavilá et al., 2019; Bueno-Gavilá et al., 2021). Peptides from the hydrolysis of caseins have demonstrated potent biological

activity that makes them potential ingredients of functional foods or health-promoting foods (Phelan et al., 2009; Maolin et al., 2018).

The vegetable coagulant species most commonly used in cheese production is *Cynara cardunculus* L., however, when its availability is scarce and it is not enough to cover the demand for the cheese specialties produced with it, the species *Cynara humilis* L. is used (Ordiales et al., 2016). For this reason, the search for new thistle species with potential for use in cheese production has gained importance in recent years (Mozzon et al., 2020; Foligni et al., 2022; Bande-De León et al., 2023). To the authors' knowledge, no goat cheeses have been made from *Cynara humilis* L. and *Onopordum platylepis* Murb. thistle species.

In latest years, there has been an increasing interest in using hydrolysates with high content of bioactive peptides from milk or dairy products. This is because milk is the main source of bioactive peptides with several different properties (Bueno-Gavilá et al., 2020). In the production of dairy products, the enzymatic hydrolysis of caseins results in the production of bioactive peptides and is directly related to the proteolytic capacity of the coagulants. For the first time, bovine casein hydrolysates were prepared with extracts of *Cynara humilis* L. and *Onopordum platylepis* Murb. and the bioactivity of the peptides produced by enzymatic hydrolysis was evaluated.

This study aims firstly to evaluate the effect of the type of coagulant on the proteolysis of the Murcia al vino cheese and secondly to determine the bioactivity of casein hydrolysates from different thistle species. This preliminary study of the bioactivity of casein hydrolysates is important to investigate the applicability of

CC, CH and OP extracts in the production of dairy products with bioactive peptides.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Biological material

Several types of milk coagulants were used to produce the cheeses: animal rennet (AR), commercial vegetable coagulant (COM), a coagulant mixture of animal rennet and freeze-dried extract from the species *Onopordum platylepis* Murb. (AR/OP), liquid crude vegetable coagulant from *Cynara cardunculus* (CC) and freeze-dried crude vegetable coagulants from *Cynara humilis* (CH). The commercial liquid animal rennet (75 RU) is from lamb and was supplied by Cuajos Caporal (Valladolid, Spain). The commercial liquid vegetable coagulant used is made from the thistle species *Cynara cardunculus* L. (1:15000) and was supplied by Dairy and Food S.R.L. (Bologna, Italy). The coagulant from the mixture of animal rennet and vegetable coagulant from the spontaneously growing *Onopordum platylepis* Murb. species was prepared by mixing 1.5mL of animal rennet with 50 mL of *O. platylepis* freeze-dried extract reconstituted in water at a concentration of 20mg/mL. The liquid crude vegetable coagulant was prepared from dried thistle flowers of *Cynara cardunculus* L. species.

Spontaneously grown flowers from the thistle species *Cynara cardunculus* L. (CC), *Cynara humilis* L. (CH), and *Onopordum platylepis* Murb. (OP) were collected. CC and CH flowers were collected from Cáceres, Spain, and the OP flowers from Sousse, Tunisia. The freeze-dried extracts from CH and OP were prepared as described by Tejada and Fernández Salguero (2003), using a freeze-dryer Alpha 1-2LD plus (Christ, Osterode am Harz, Germany). The

powdered extract obtained was frozen at -20°C until use. The aqueous extract of CC was prepared by macerating 12 grams of crushed dried flowers in 100 mL of chloride-free mineral water.

2.2 Cheesemaking:

Two batches of milk from different milking days were used to produce two batches of cheese with six pieces each, for a total of 12 cheese samples from each coagulant under study. The procedure specified in the Murcia al vino Protected Designation of Origin (PDO) regulations was followed. All the cheese samples weighed about 500g and were ripened for 30 days. All samples were transported to the laboratories under refrigerated conditions and kept at 4°C until analysis. The doses at which coagulants were added are shown in Table 1.

2.3 Cheese proteolysis

2.3.1 Nitrogen fractions

The determination of the water-soluble nitrogen and non-protein nitrogen fractions of the cheeses was carried out as described by Abellán et al. (2012b). Grated cheese (10 g) mixed with three times the sample weight of water was homogenised for 2 min, and the homogenate was held at 40°C for 1 h. To obtain the WSN, the solution was adjusted to pH was adjusted to 4.6 with HCl 0.1 N; to obtain the NPN, Trichloroacetic acid at 12% was added to the solution. Both suspensions were centrifuged for 30 min at 5°C and 4800x g, and the supernatant was filtered. In the case of the WSN fraction, the filtrate was diluted to a final volume of 100mL.

2.3.2 Free amino acids content

The free amino acid content was obtained according to Abellán et al. (2012a) using WSN fraction of the cheeses prepared as mentioned above. Sulfosalicylic acid (SSA) was added to 10 mL of the WSN fraction to a final concentration of 2.5% w/v SSA, then centrifuged at 4800x *g* for 30 min, and the pH of the supernatant was adjusted to 4.0. It was kept at -22°C until analysis. To identify amino acids, a standard solution was used to establish retention times. Data acquisition and integration of the chromatogram peaks were performed using 32 Karat v. 7.0 software (Beckman Coulter, CA, USA).

2.3.3 Peptide profile by RP-HPLC

The concentration of Hi and Ho peptides of the cheeses was determined by reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) using the method described by Abellán et al. (2012b). The different nature of the peptides was estimated based on the retention time, considering Ho peptides those that appeared after the peak corresponding to the amino acid tryptophan (L-Trp ≥ 98%, Sigma-Aldrich, Madrid, Spain), and Hi peptides that appeared in the portion of peptides retained between the amino acid tyrosine (L-Tyr, +99%, Acros Organics, Fairlawn, NJ, USA) and the amino acid tryptophan. These determinations were conducted in triplicate for each type of cheese.

2.4 Evaluation of peptide bioactivity

2.4.1 Bovine casein hydrolysates

Bovine casein hydrolysates were prepared at 1% (w/v) at pH 6.2 following the procedure described by Bueno-Gavilá et al. (2019). Aliquots of 9mL of the casein solution were heated in a water bath at 50°C with constant stirring. Once the casein solution reached the set temperature, 360 µL of the lyophilized thistle

extracts, reconstituted in distilled water at a concentration of 40 mg/mL, were added. After 16 hours, the reaction was stopped by increasing the temperature to 100°C for 5 min. The pH was decreased to 4.6 and then centrifuged at 4000x g for 20 min. The supernatant was filtered through 0.45 µm Nylon filters, and the filtrate obtained was pH adjusted to 7.0 and frozen until use.

2.4.2 Peptide sequence identification and related bioactivity

The identification was determined by tandem mass spectroscopy (MS) analysis using non-liquid chromatography following the method described by Bueno-Gavilá et al. (2019). Aliquots of the bovine casein hydrolysates described above are used for the analysis. Peptides were separated using an Acclaim™ PepMap™ C18 column (75 µm x 50 cm, Thermo Scientific, Massachusetts, USA) at a constant temperature of 40°C for 85 minutes. Two solvents were used for chromatographic separation, solvent A) 0.1% formic acid in water and solvent B) 0.1% formic acid in 20% acetonitrile with a flow rate of 300 nL/min. The quantification was performed using the software Proteome Discoverer v.2.1.0.81 (Thermo Scientific, Massachusetts, USA). In order to compare between samples, the quantification values were normalized using the total peptide spectral matches (PSM) for all peptides in the sample using the R program version 3.4.1 (www.r-project.org). Finally, the identified peptides were imported into the BIOPEP database.

2.5 Statistical Analysis

The cheeses proteolysis data were analyzed by One-way analysis of variance (ANOVA) to assess the effect of the type of coagulant using the software package SPSS 21.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). The level for statistical

significance was set at $p < 0.05$. To establish significant differences between groups, Tukey's LSD test was performed.

2 RESULTS AND DISCUSSION

2.1 Effect of the type of coagulant on proteolysis

The type of coagulant significantly affected ($p < 0.05$) the NPN and WSN content of the cheeses (Table 2). In both fractions, cheeses made with vegetable coagulants (OP, CC, COM, and CH) presented significantly higher values than those made with AR and OP/AR. The OP cheese presented the highest values of the nitrogen fractions evaluated here. The results of this study are in agreement with those reported by other authors who also found higher WSN and NPN content in goat cheeses made with vegetable coagulants versus those made with animal rennet (Abellán et al., 2012b; Pino et al., 2009).

The WSN fraction is related as one of the factors of primary proteolysis that occurs with the initial breakdown of caseins produced by residual coagulant and plasmin, while the NPN fraction is an indicator of the secondary proteolysis generated for the hydrolysis of proteinases and peptidases from the lactic acid bacteria (Rako et al., 2022). In this regard, it has been shown that vegetable aspartic proteases are more proteolytic than animal rennet, generating a greater amount of large and medium peptides after primary hydrolysis, which serve as a substrate for lactic acid bacteria in secondary hydrolysis, generating a greater amount of small peptides and free amino acids. (Galán et al., 2008; Tejada et al., 2008a; Tejada and Fernández-Salguero 2003). On the other hand, the differences in proteolysis between the different vegetable coagulants are not only due to the difference in their caseinolytic capacity, but are also influenced by the

amount of coagulant added. (Galán et al., 2008; Bueno-Gavilá et al., 2020). Thus, the higher proteolysis in cheeses made with OP compared to cheeses made with other vegetable aspartic proteases may be due to the difference in the amount of coagulant used in cheesemaking.

The type of coagulant significantly ($p < 0.05$) affected the free amino acid content of the cheeses (Table 3). However, there is no common pattern in all vegetable coagulants, probably due to differences in the specificity of each protease in the hydrolysis of caseins and peptides. In addition, the action of lactic acid bacteria is fundamental in the breakdown of caseins, being the main factor in the production of free amino acids in cheese. Therefore, the differences in the content of free amino acids are mainly attributed to both factors; the type of coagulant and the microbial load of the cheese (Abellán et al., 2012b). However, two amino acids that proved to be highly related to proteolysis are Tyr and Trp (Fernández-Salguero et al., 2002). Accordingly, the coagulants elaborated with *Cynara cardunculus* flowers (COM and CC) presented the highest values of these amino acids ($p < 0.05$). These results are in agreement with those reported by Bande-De León (2023) on the proteolysis of CC, CH and OP, with CC being the species with the highest caseinolytic activity.

Significant differences ($p < 0.05$) were found between the content of Ho and Hi peptides and in the Ho/Hi ratio (Table 4). The Ho peptide content was higher in cheeses made with vegetable coagulants (OP, CC, COM, and CH) than with AR and AR/OP. In a study comparing the peptide profile of goat cheeses made with animal rennet and an extract of CC, they concluded that cheeses made with CC showed higher Ho peptide content and a higher Ho/Hi ratio, attributing this to the fact that CC proteinases hydrolyze the peptide bonds of the hydrophobic

zones of the caseins (Pino et al., 2009). On the other hand, no significant differences in the Hi peptide content were found in the research carried out by Pino et al. (2009), differing from the results herein collected where the type of coagulant did significantly affect the Hi peptide content. In this study, the highest Hi peptide content was found in AR and CH, and the lowest values were obtained by OP and COM, while CC and AR/OP had intermediate values.

3.3 Identification of bioactive peptides from casein hydrolysates

3.3.1 Bioactive peptide sequencing

The peptides present in the hydrolysates were sequenced by LC-MS/MS. The number of different peptides sequenced in the CH, CC, and OP samples were 13343, 11279, and 9153, respectively, with the CH hydrolysate being the sample with the highest concentration of peptides, followed by CC, and OP with the lowest amount. These results are in agreement with the findings of Bande-De León (2023) who investigated the proteolysis of bovine casein by these three species, with OP being the species with the lowest proteolytic activity and CC and CH presenting similar activity.

To find the bioactivity of the peptide sequences identified in the different casein hydrolysates, these sequences were searched in the BIOPEP database. As result, 2 types of biopeptides were detected: those in their bioactive form in the casein hydrolysates; and potential ones, which contain bioactive sequences within their primary structure. According to the peptides found in their bioactive form, Table 5 shows the peptide sequences found in the hydrolysates of CH, CC and OP, respectively, 20, 15 and 5 peptide sequences. Those peptide sequences that were unique to the hydrolysates of each of the species and were not common

among them are shown in red in Table 5. Four unique sequences were found in the hydrolysates of CC that were not found in the hydrolysates of CH and OP, and nine sequences were found only in the CH hydrolysate, which were not found in the rest. The five OP bioactive peptide sequences were also found in the hydrolysates of the other species. The hydrolysate from CH reported the highest number of bioactive peptide sequences. Some of the sequences herein reported were also found by Bueno-Gavilá (2019) in a similar investigation in which the bioactivity of peptides from a bovine casein hydrolysate with the thistle species *Cynara scolymus* was evaluated.

3.3.2 *Bioactivity of peptide sequences*

For the quantification of bioactive peptides, peptide spectral matches (PSM) were considered, and the presence of bioactive sequences within their primary structure was evaluated (Figures 1-3). In Figure 1, where the color blue indicates a lower quantity of bioactive peptides, and the color red indicates a higher presence, it can be observed that OP casein hydrolysates have a higher amount of bioactive peptides exhibiting activity as stimulant, anti-amnesic, antidiabetic, antithrombotic, opioid agonist, etc. (interpreted as intensification of red color). Casein hydrolysates from CC showed a greater amount of bioactive peptides osteoanabolic, antiapoptotic, lipoxygenase inhibitory, anti-inflammatory, antioxidant, hypolipidemic, hemolytic, etc. The bioactivity of peptides from CH hydrolysates were related to opioid antagonist, alpha-glucosidase inhibitor, angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor, hypotensive, anticancer, antiviral, antibacterial and dipeptidyl peptidase IV inhibitor.

For a better understanding, Figure 2 shows individually in which sample each group of activities highlights for each bioactivity cluster (bioactivity group).

The results of the peptides identified that have potential bioactivity because of containing bioactive sequences within their primary structures show that all casein hydrolysates showed great potential as a source of this type of precursor (Figure 3). The peptidic precursors of OP hydrolysates exert, for example, potential antidiabetic, antifungal, immunostimulatory and immunomodulatory, antithrombotic and insulin secretion inhibitory activities. In the case of the peptidic precursors of CH, exhibit hypotensive, haemolytic, antiviral, antioxidative, anticancer, antibacterial, anti-apoptotic, and opioid agonist activity. CC demonstrated precursors of activities such as hypolipidemic, HMG-CoA reductase inhibitor, CaMPDE inhibitor, BChE inhibitor, and anti-inflammatory.

3 CONCLUSIONS

Cheeses made with vegetable coagulants showed a higher degree of proteolysis than those made with animal rennet. Comparing between vegetable coagulants, the cheese made with OP presented higher amounts of NPN, WSN and hydrophobic peptides (Ho) than those made with COM, CC and CH. The COM and CC cheeses obtained the highest concentration of amino acids tyr and trp, indicators related to increased proteolysis. All thistle species were proven to generate bioactive peptide sequences in bovine casein hydrolysates. CH hydrolysates presented higher amounts of peptides with potential bioactivity than CC and OP hydrolysates, respectively. CC, CH and OP extracts proved to be a valid option for obtaining bioactive peptides in

dairy hydrolysates, however, the bioactivity of peptides produced in cheeses is currently under study.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work is supported by the Ministry of Economy, Industry and Competitiveness -through the Agencia Estatal de Investigación (AEI-MINECO, PCI2019-103551, España) and the Italian Ministry of Education, University and Research (MIUR) and is part of the PRIMA programme supported by the European Union. Project title: "Valorisation of thistle-curdled CHEESEs in MEDiterranean marginal areas" (<https://veggiemedcheeses.com/>).

REFERENCES

- Abellán, A., Cayuela, J.M., Pino, A., Martínez-Cachá, A., Salazar, E., and Tejada, L. 2012a. Free amino acid content of goat's milk cheese made with animal rennet and plant coagulant. *J. Sci. Food Agric.* 92:1657-1664. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5528>
- Abellán, A., Tejada L., Pérez-Garrido, A., Salazar, E., Martínez-Cachá, A., and Cayuela, J.M. 2012b. Effects of cheese size on composition and proteolysis in goat's milk cheese. *A. Alim.* 41:180-189. <https://doi.org/10.1556/AAlim.41.2012.2.5>
- Bande-De León, C., Buendía-Moreno, L., Abellán, A., Manzi, P., Al Mohandes Dridi, B., Essaidi, I., Aquilanti, L., and Tejada, L. 2023. Clotting and Proteolytic Activity of Freeze-Dried Crude Extracts Obtained from Wild Thistles *Cynara humilis* L. and *Onopordum platylepis* Murb. *Foods* 12:2325. <https://doi.org/10.3390/foods12122325>

- Bueno-Gavilá, E., Abellán, A., Bermejo, M.S., Salazar, E., Cayuela, J.M., Prieto-Merino, D., and Tejada, L. 2020. Characterization of proteolytic activity of artichoke (*Cynara scolymus* L.) flower extracts on bovine casein to obtain bioactive peptides. *Animals* 10:914. <https://doi.org/10.3390/ani10050914>
- Bueno-Gavilá, E., Abellán, A., Girón-Rodríguez, F., Cayuela J.M., Salazar, E., Gómez, R., and Tejada, L. 2019. Bioactivity of hydrolysates obtained from bovine casein using artichoke (*Cynara scolymus* L.) proteases. *J. Dairy Sci.* 102:10711-10723. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16596>
- Bueno-Gavilá, E., Abellán, A., Girón-Rodríguez, F., Cayuela J.M., Salazar, E., Gómez, R., and Tejada, L. 2021. Bioactivity of hydrolysates obtained from chicken egg ovalbumin using artichoke (*Cynara scolymus* L.) proteases. *Foods* 10:246. <https://doi.org/10.3390/foods10020246>
- Fernández-Salguero, J., Tejada, L., and Gómez, R. 2002. Use of powdered vegetable coagulant in the manufacture of ewe's milk cheeses. *J. Sci. Food Agric.* 82:464-468. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1066>
- Foligni, R., Mannozi, C., Gasparini, M., Raffaelli, N., Zamporlini, F., Tejada, L., Bande-De León, C., Orsini, R., Manzi, P., Di Costanzo, M.G., Ritota, M., Aquilanti, L., and Mozzon, M. 2022. Potentialities of aqueous extract from cultivated *Onopordum tauricum* (Willd.) as milk clotting agent for cheesemaking. *Food Res. Int.* 158. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111592>
- Galán, E., Prados, F., Pino, A., Tejada L., Fernández-Salguero, J.

- Maolin, T., Hanxiong, L., Chen, H., Fengjiao, F., Pujie, S., Xianbing, X., Weihong, L., and Ming, D. 2018. Bioactive hydrolysates from casein: Generation, identification, and *in silico* toxicity and allergenicity prediction of peptides. *J. Sci. Food Agric.* 98:3416-3426. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8854>
- Mazorra-Manzano, M.A., Perea-Gutiérrez, T.C., Lugo-Sánchez, M.E., Ramirez-Suarez, J.C., Torres-Llanez, M.J., González-Córdova, A.F., and Vallejo-Cordoba, B. 2013. Comparison of the milk-clotting properties of three plant extracts. *Food Chem.* 141;1902-1907. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.042>
- Mozzon, M., Foligni, R., Mannozi, C., Zamporlini, F., Raffaelli, N., and Aquilanti, L. 2020. Clotting properties of *Onopordum tauricum* (Willd.) aqueous extract in milk of different species. *Foods* 9:692. <https://doi.org/10.3390/foods9060692>
- Ordiales, E., A. Martín, M.J. Benito, S. Ruiz-Moyano, G. Gallardo, and M.D. Córdoba. 2016. Characterisation of the vegetable rennets used for 'Torta del Casar' cheesemaking by a protein profile method. *Int. J. of Dairy Technol.* 69:272-281. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12254>
- Phelan, M., Aherne-Bruce, S.A., O'Sullivan, D., FitzGerald, R.J., and O'Brien, N.M. 2009. Potential bioactive effects of casein hydrolysates on human cultured cells. *Int. Dairy J.* 19:279-285. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.12.004>

- Pino, A., Prados, F., Galán, E., McSweeney, P.L.H., and Fernández-Salguero, J. 2009. Proteolysis during the ripening of goats' milk cheese made with plant coagulant or calf rennet. *Food Res. Int.* 42:324-330. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.12.009>
- Rako, A., Kalit, M.T., Rako, Z., Zamberlin, Š., Kalit, S. 2022. Contribution of salt content to the ripening process of Croatian hard sheep milk cheese (Brač cheese). *LWT* 162:113506. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113506>
- Saldo, J., McSweeney, P.L.H., Sendra, E., Kelly, A.L., and Guamis, B. 2002. Proteolysis in caprine milk cheese treated by high pressure to accelerate cheese ripening. *Int. Dairy J.* 12:35-44. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00169-8](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00169-8)
- Sánchez, E.S., Simal, S., Femenia, A., Llull, P., and Roselló, C. 2001. Proteolysis of Mahon cheese ad affected by acoustic-assisted brining. *Eur Food Res Technol.* 212:147-152. <https://doi.org/10.1007/s002170000263>
- Tejada, L., Abellán, A., Cayuela, J.M., Martínez-Cachá, A., and Fernández-Salguero, J. 2008a. Proteolysis in goats' milk cheese made with calf rennet and plant coagulant. *Int. Dairy J.* 18:139-146. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.08.010>
- Tejada, L., Abellán, A., Prados, F., and Cayuela, J.M. 2008b. Compositional characteristics of Murcia al Vino goat's cheese made with calf rennet and

plant coagulant. *Int. J. Dairy Technol.* 61:119-125.

<https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2008.00396.x>

Tejada, L., Buendía-Moreno, L., Hernández, I., Abellán, A., Cayuela, J.M., Salazar, E., and Bueno-Gavilá, E. 2022. Bioactivities of mealworm (*Alphitobius diaperinus* L.) larvae hydrolysates obtained from artichoke (*Cynara scolymus* L.) proteases. *Biology* 11:631.

<https://doi.org/10.3390/biology11050631>

Tejada, L., and Fernández-Salguero, J. 2003. Chemical and microbiological characteristics of ewe milk cheese (Los Pedroches) made with a powdered vegetable coagulant or calf rennet. *Ital. J. Food Sci.* 15:125-131.

Table 1. Dose of coagulants used

	Type of milk coagulant					
	AR ²	COM ²	OP ¹	AR/OP ²	CC ¹	CH ¹
Dose	4.0	0.35	1.7	51.5	100	0.28

AR = commercial liquid animal rennet, COM = commercial vegetable coagulant from *Cynara cardunculus* L., OP = *Onopordum platylepis* Murb., AR/OP = mixture of animal rennet and freeze-dried extract from the species *Onopordum platylepis* Murb., CC = *Cynara cardunculus* L., CH = *Cynara humilis* L.

¹grams of freeze-dried extract per L of milk

²ml of coagulant per L of milk

Table 2. Effect of coagulant type on nitrogen fractions of Murcia al vino cheese

	AR	COM	OP	AR/OP	CC	CH	p-Value
Total N ¹	3.78±0.09 ^a	3.56±0.15 ^a	2.99±0.25 ^a	3.48±0.28 ^a	3.34±0.06 ^a	3.36±0.02 ^a	0.0645
NPN ²	6.77±0.41 ^d	7.93±0.46 ^c	9.73±0.55 ^a	5.77±0.41 ^b	6.90±0.12 ^d	7.60±0.29 ^{cd}	0.0002
WSN ²	12.34±0.26 ^d	15.66±0.85 ^b	23.65±2.19 ^c	11.86±0.79 ^d	18.48±0.36 ^a	21.28±0.40 ^c	0.0000

AR = commercial liquid animal rennet, COM = commercial vegetable coagulant from *Cynara cardunculus* L., OP = *Onopordum platylepis* Murb., AR/OP = mixture of animal rennet and freeze-dried extract from the species *Onopordum platylepis* Murb., CC = *Cynara cardunculus* L., CH = *Cynara humilis* L.

¹Expressed as g/100g cheese

²Expressed as g/100g total N

Results are expressed as mean ± standard error of mean (SEM). The means were analyzed using One-way ANOVA at a significance level of P < 0.05.

^{a-c} different superscript letters in a row mean significant differences (LSD test, P < 0.05).

Table 3. Effect of coagulant type on the free amino acid content of Murcia al vino cheese

	AR	COM	OP	AR/OP	CC	CH	p-value
Ala	2.546 ^{ab}	2.644 ^a	1.816 ^d	1.482 ^{cd}	2.019 ^{bd}	1.118 ^c	0.0000
Arg	0.971 ^{bc}	1.111 ^b	0.906 ^{bc}	0.861 ^c	1.415 ^a	1.033 ^{bc}	0.0003
Asn	4.550 ^a	1.332 ^b	6.346 ^a	3.738 ^{ab}	1.280 ^b	3.599 ^{ab}	0.0101
Asp	1.059 ^{bc}	1.390 ^a	1.165 ^c	1.036 ^b	1.152 ^c	1.120 ^{bc}	0.0000
Cys	<0.50 ^a	<0.50 ^a	<0.50 ^a	<0.50 ^a	<0.50 ^a	<0.50 ^a	ns
Glu	2.164 ^c	2.512 ^b	2.266 ^{bc}	1.936 ^c	2.490 ^b	1.620 ^a	0.0000
Gln	1.973 ^a	1.070 ^b	1.524 ^{ab}	0.766 ^b	1.031 ^b	1.145 ^b	0.0194
Gly	0.568 ^{ab}	0.585 ^a	0.512 ^{bc}	0.510 ^c	0.515 ^c	0.529 ^{bc}	0.0109
His	1.410 ^{bc}	1.586 ^d	0.932 ^{bc}	0.712 ^c	2.022 ^a	1.478 ^d	0.0000
Ile	2.195 ^a	2.046 ^a	1.697 ^b	1.556 ^b	1.711 ^b	1.524 ^b	0.0000
Leu	0.810 ^a	6.831 ^{ac}	5.387 ^{bc}	4.365 ^b	7.352 ^{ac}	5.870 ^{bc}	0.0045
Lys	0.546 ^c	1.105 ^{ab}	0.786 ^{bc}	0.530 ^c	1.472 ^a	0.770 ^{bc}	0.0034
Met	1.129 ^{ab}	1.274 ^a	0.806 ^d	0.805 ^d	1.100 ^{bc}	0.958 ^{cd}	0.0000
Phe	4.402 ^a	3.961 ^c	3.411 ^{de}	3.040 ^e	3.686 ^{cd}	2.476 ^b	0.0000
Pro	3.668 ^a	3.088 ^c	1.757 ^b	2.306 ^d	2.697 ^{cd}	2.344 ^d	0.0000
Ser	1.134 ^a	0.818 ^{ab}	0.500 ^b	0.500 ^b	0.575 ^b	0.793 ^{ab}	0.0283
Trn	0.743 ^{abc}	0.693 ^{bc}	0.561 ^c	0.500 ^c	0.952 ^a	0.923 ^{ab}	0.0075
Trp	0.967 ^{bc}	1.040 ^c	0.821 ^{ab}	0.764 ^a	0.987 ^c	0.953 ^{bc}	0.0010
Tyr	0.611 ^{cd}	0.859 ^b	1.133 ^a	0.592 ^d	0.715 ^c	0.586 ^d	0.0000
Val	2.500 ^b	2.605 ^b	1.343 ^c	1.387 ^c	2.033 ^a	1.268 ^c	0.0000

AR = commercial liquid animal rennet, COM = commercial vegetable coagulant from *Cynara cardunculus* L., OP = *Onopordum platylepis* Murb., AR/OP = mixture of animal rennet and freeze-dried extract from the species *Onopordum platylepis* Murb., CC = *Cynara cardunculus* L., CH = *Cynara humilis* L.

Results are expressed as (umol/g). ns = no significant

Table 4. Effect of coagulant type on the peptide profile of Murcia al vino cheese

	AR	COM	OP	AR/OP	CC	CH	p-Value
Ho	198.15±53.25 ^c	317.28±24.68 ^{ab}	406.23±49.97 ^b	176.20±12.22 ^c	353.62±30.95 ^b	258.40±12.01 ^{ac}	0.0014
Hi	49.76±9.72 ^a	14.61±0.79 ^c	17.85±0.25 ^c	6.12±0.25 ^b	8.86±0.83 ^b	49.71±3.17 ^a	0.0000
Ho/Hi	5.20±2.08 ^d	21.00±0.47 ^c	22.80±3.12 ^c	28.70±0.92 ^b	40.18±2.01 ^a	5.28±0.49 ^d	0.0000

AR = commercial liquid animal rennet, COM = commercial vegetable coagulant from *Cynara cardunculus* L., OP = *Onopordum platylepis* Murb., AR/OP = mixture of animal rennet and freeze-dried extract from the species *Onopordum platylepis* Murb., CC = *Cynara cardunculus* L., CH = *Cynara humilis* L., Ho = hydrophobic peptides, Hi = hydrophilic peptides, Ho/Hi = ratio of hydrophobic to hydrophilic peptide.

Results are expressed as mean ± standard error of mean (SEM) of the total peak area. The means were analyzed using One-way ANOVA at a significance level of P < 0.05. ^{a-c} different superscript letters in a row mean significant differences (LSD test, P < 0.05).

Table 5. Peptide sequences identified in bovine casein hydrolysates from *Cynara cardunculus* (CC), *Cynara humilis* (CH) and *Onopordum platylepis* (OP) proteases that were registered in the bioactive peptide database (BIOPEP)

Sequence	ID	Name	Chemical mass	IC50 (μM)	Activity
<i>Cynara cardunculus</i>					
AYFYPELF	8377	ACE inhibitor from alphas1-CN (143-150)	1049.1715	-	ACE inhibitor
GVSKVKEAMAPKHKEMPFKYPVEPFTESQ	9853	Peptide stimulating mucin secretion	3417.9414	-	stimulating
HQPHQPLPPTVMFPPQ	10186	Zinc binding peptide	1851.1311	-	binding
INNQFLPYPY	9231	dipeptidyl peptidase IV inhibitor (DPP IV inhibitor)	1268.4124	40.08	dipeptidyl peptidase IV inhibitor
KTVYQHQAAMKPWIQPKTKVIPYVRYL	8255	f(181-207) of bovine alpha s2-casein	3345.0034	-	antibacterial
	8273	Cr1			
LLYQEPVLPVIRGPFPIIV	8174	peptide derived from bovine b-casein (1-28)	2107.5295	-	immunomodulating
	8171				
RPKHPIKHQGLPQEVLNENLLRF	3035	Isracidin - peptide derived from alphaS1-casein (1-23)	2764.1833	-	antibacterial
	9530				
SDIPNPIGSENSEK	8335	f(195-208) of alpha S1 casein	1486.5331	-	antibacterial
SQSKVLPVPQKAVPYPQ	9907	Antioxidative peptide	1866.1592	-	antioxidative

VEELKPTPEGDLEIL	10170	Zinc binding peptide	1681.8731	-	binding
VYQHQQAMKPWIQPKTKVIPY	3966	-	258.4082	-	haemolytic
	3965	-	3002.5708	-	haemolytic
VYQHQQAMKPWIQPKTKVIPYVRY	3033	CaMPDE inhibitor		-	CaMPDE inhibitor
	3435	f(183-206) of bovine alpha s2-casein		-	antibacterial
VYQHQQAMKPWIQPKTKVIPYVRYL	3034	CaMPDE inhibitor	3115.728	-	CaMPDE inhibitor
	5469	(fr.183-207 of bovine alpha s2-casein)		-	antibacterial
	3964	-		-	haemolytic
WMHQPHQPLPPTVM	10184	Zinc binding peptide	1699.0052	-	binding
YQKFPQY	9254	ACE inhibitor	973.079	20.08	ACE inhibitor
<hr/> <i>Cynara humilis</i> <hr/>					
ALPQYLKTVYQHQQ	9904	Antioxidative peptide	1716.9716	-	antioxidative
AMKPWIQPKTKVIPYVRYL	3030	CaMPDE inhibitor	2331.8558	-	CaMPDE inhibitor
AYFYPELF	8377	ACE inhibitor from alphas1-CN (143-150)	1049.1715	-	ACE inhibitor
FSDKIAK	8266	Antibacterial peptide	807.9315	-	antibacterial
	8181	ACE inhibitor		113.6	ACE inhibitor
GVSKVKEAMAPKHKEMPFKYPVEPFTESQ	9853	Peptide stimulating mucin secretion	3417.9414	-	stimulating
HIQKEDVPSER	9559	antioxidative	1337.4346	-	antioxidative

HKEMPFKYPVEPF	10188	Zinc binding peptide	1746.0322	-	binding
HKEMPFKYPVEPFTESQ	9896	Antioxidative peptide	2191.4555	-	antioxidative
INNQLPYPY	9231	dipeptidyl peptidase IV inhibitor (DPP IV inhibitor)	1268.4124	40.08	dipeptidyl peptidase IV inhibitor
KTVYQHQAAMKPWIQPKTKVIPYVRYL	8273	Cr1	3345.0034	-	antibacterial
	8255	f(181-207) of bovine alpha s2-casein		-	antibacterial
LLYQEPVLPVVRGPFPIIV	8174	peptide derived from bovine b-casein (1-28)	2107.5295	-	immunomodulating
NAVPITPTL	10253	Antioxidative peptide	925.0774	-	antioxidative
	10250	Osteoanabolic peptide		-	osteoanabolic
RPKHPIKHQ	7483	ACE inhibitor (fr. of as1-casein, 1-9)	1140.3379	13	ACE inhibitor
RPKHPIKHQGLPQEVLENLLRF	3035	isracidin	2764.1833	-	antibacterial
	8171	Isracidin - peptide derived from alphaS1-casein (1-23)		-	immunomodulating
	9530	Isracidin - antiviral		-	antiviral
SQSKVLPVPQKAVPYPQ	9907	Antioxidative peptide	1866.1592	-	antioxidative
VKEAMAPK	7796	Lipoxygenase inhibitor	873.0703	-	lipoxygenase inhibitor
	9561	Antioxidative peptide		-	antioxidative
VYQHQAAMKPWIQPKTKVIPY	3966	-	2584.0820	-	haemolytic
VYQHQAAMKPWIQPKTKVIPYVRY	3965	-	3002.5708	-	haemolytic
	3033	CaMPDE inhibitor		-	CaMPDE inhibitor

	3435	f(183-206) of bovine alpha s2-casein		-	antibacterial
VYQHQQAMKPWIQPKTKVIPYVRYL	5469	(fr.183-207 of bovine alpha s2-casein)	3115.7280	-	antibacterial
	3034	CaMPDE inhibitor		-	CaMPDE inhibitor
	3964	-		-	haemolytic
YQKFPQY	9254	ACE inhibitor	973.0790	20.08	ACE inhibitor
<hr/> <i>Onopordum platylepis</i> <hr/>					
LLYQEPVLGPVRGPFPIIV	8174	peptide derived from bovine b-casein (1-28)	2107.5295	-	immunomodulating
RPKHPIKHQGLPQEVLNENLLRF	9530	Isracidin - antiviral	2764.1833	-	antiviral
	8171	Isracidin - peptide derived from alphaS1-casein (1-23)		-	immunomodulating
	3035	isracidin		-	antibacterial
SQSKVLPVPQKAVPYPQ	9907	Antioxidative peptide	1866.1592	-	antioxidative
VYQHQQAMKPWIQPKTKVIPYVRYL	5469	(fr.183-207) of bovine alpha s2-casein	3115.7280	-	antibacterial
	3034	CaMPDE inhibitor		-	CaMPDE inhibitor
	3964	-		-	haemolytic
YQKFPQY	9254	ACE inhibitor	973.0790	20.08	ACE inhibitor

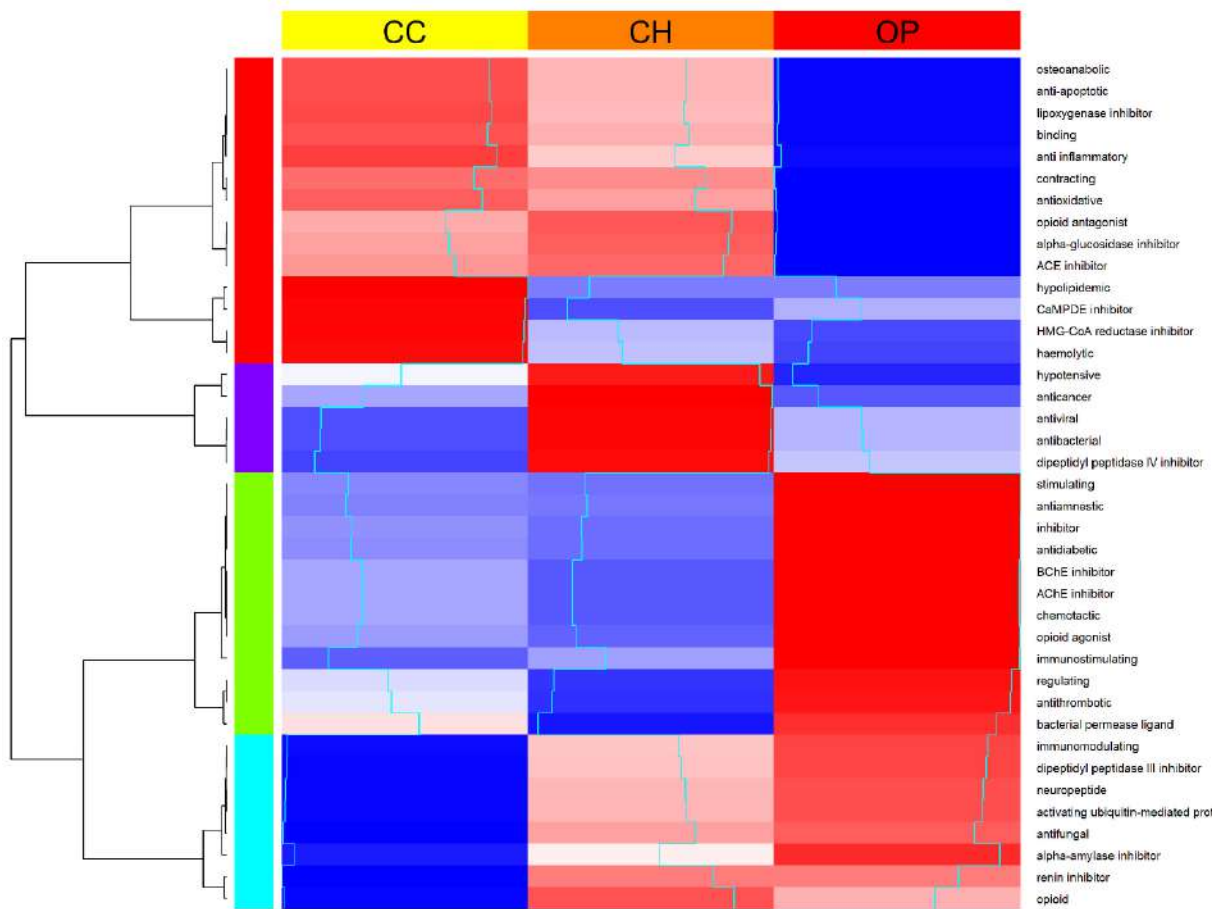


Figure 1. Heatmap and dendrogram of bioactivities of the different replicates evaluated from *Cynara cardunculus* (CC), *Cynara humilis* (CH) and *Onopordum platylepis* (OP). Quantification of bioactivity is regarding the mean. The grouping relationship between the groups of activities is defined.

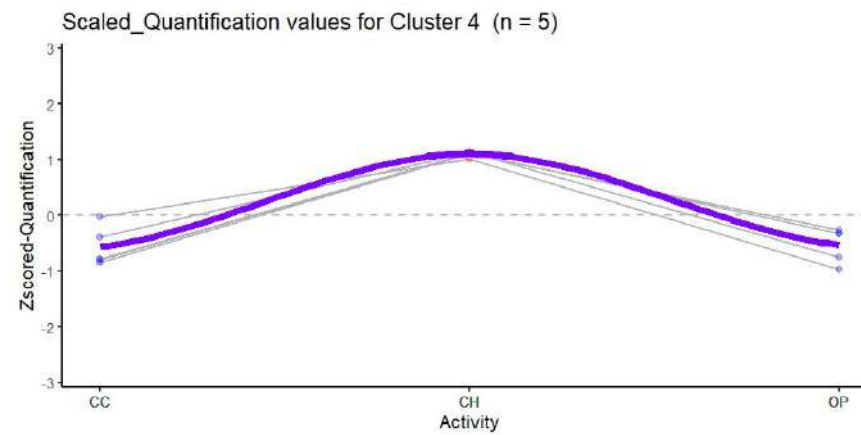
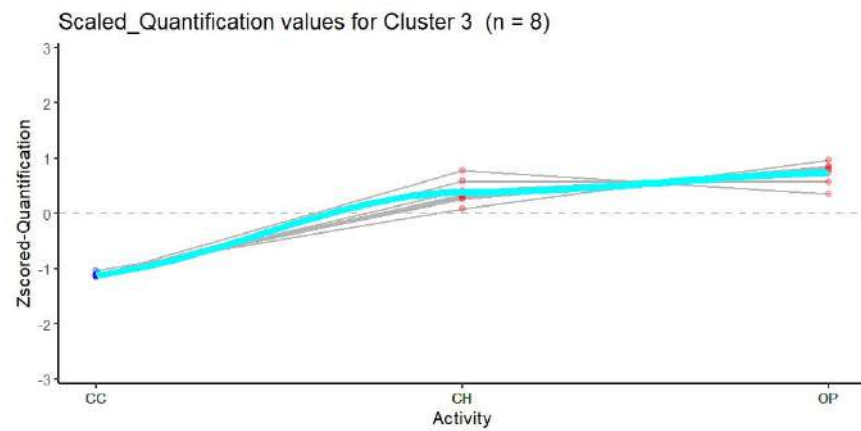
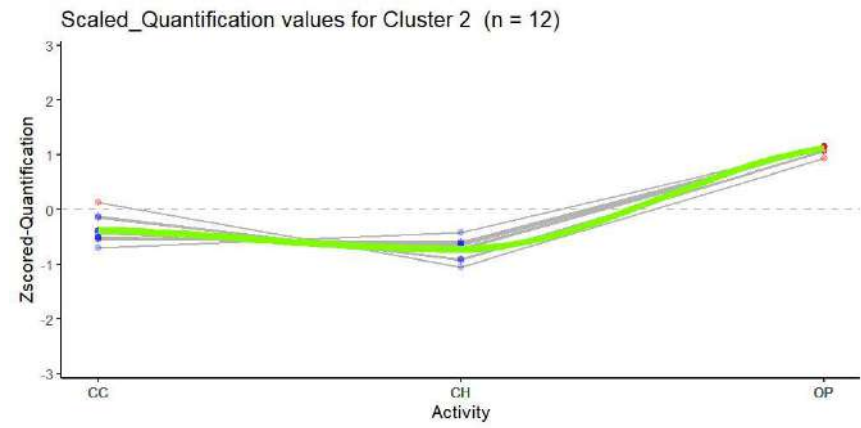
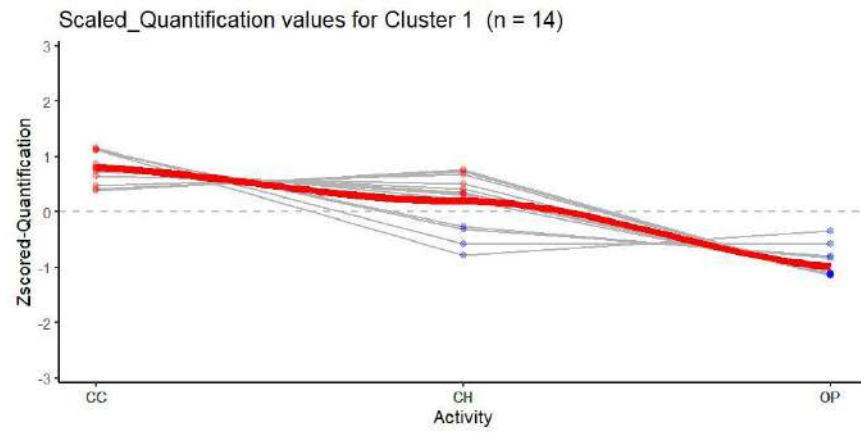


Figure 2. Representation of the bioactivity in each sample for each cluster of activities

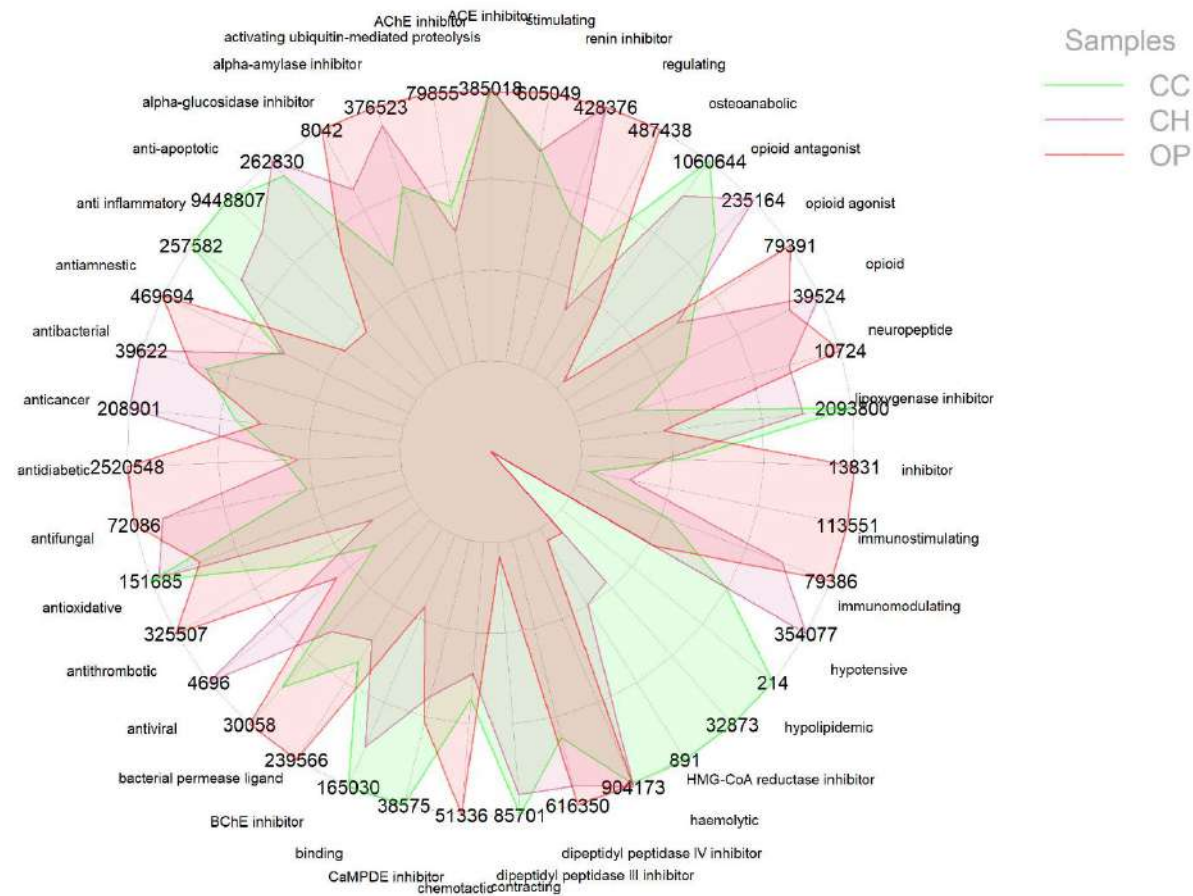


Figure 3. Standardized quantification of peptide precursors (x10³) in bovine casein hydrolysates from *Cynara cardunculus* (CC), *Cynara humilis* (CH) and *Onopordum platylepis* (OP)

VI – DISCUSIÓN

VI -DISCUSIÓN

6.1. CARACTERIZACIÓN TECNOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS DE CARDOS

Este trabajo ha permitido la caracterización tecnológica de distintas especies de cardo silvestre que crecen en los países del Mediterráneo. Los coagulantes vegetales a partir de flores de cardo de la especie *Cynara cardunculus* se emplean desde la antigüedad en la elaboración de varios tipos de queso, principalmente de leche de oveja, y muchos de ellos con Denominación de Origen Protegida. La disponibilidad de las flores de *Cynara cardunculus* depende de diversos factores, siendo, en algunas ocasiones, limitada o insuficiente para cubrir la demanda de los quesos cuajados con esta planta. Por esta razón, este trabajo se centra en la caracterización de las especies *Cynara humilis*, *Onopordum platylepis* y *Onopordum tauricum* para su uso como coagulante vegetal en la producción de queso.

Los extractos experimentales empleados en este trabajo fueron liofilizados para resolver los problemas en la elaboración del queso, atribuidos a los extractos acuosos de cardo tradicionalmente utilizados para este fin, tales como la modificación de la flora inicial de la leche y falta de uniformidad entre partidas de queso (Tejada y col., 2008a).

6.1.1. Actividad coagulante

Para caracterizar la actividad coagulante (MCA) de los extractos liofilizados se evaluó el efecto individual de la concentración de extracto, la temperatura, el pH y la concentración de cloruro cálcico sobre la actividad coagulante empleando como sustrato leche bovina desnatada. Las especies seleccionadas para el análisis fueron *Cynara humilis* (CH), *Onopordum platylepis* (OP) y *Onopordum tauricum* (OT), utilizándose la especie *Cynara cardunculus* (CC) como control debido a que es la más estudiada y empleada para este fin.

En este estudio, el valor de MCA aumentó con el incremento de la concentración de extracto ($p < 0,001$); la concentración a la que se alcanzó la máxima MCA en todas las especies fue de 40 mg/mL, y el valor más alto de MCA (409,28 SU/mL) se observó para CC a una concentración de extracto de 40 mg/mL. Los

valores máximos obtenidos para CH y OP fueron 170,64 y 63,16 (SU/mL), respectivamente.

La correlación entre la concentración de enzimas y el tiempo de coagulación es bien conocida y ha sido estudiada por numerosos autores cuyos resultados mostraron claramente una disminución del tiempo de coagulación a medida que aumenta la concentración de proteasas (Silva y Malcata, 2005). El gran rendimiento en MCA de la especie CC puede deberse a su alta capacidad caseinolítica y a su contenido en proteasas similares a la quimosina (Cardosina A y B) que actúan sobre la κ -caseína, más concretamente sobre los enlaces Fenilalanina₁₀₅-Metionina₁₀₆ (Galán y col., 2008; Chazarra y col., 2007).

Los agentes coagulantes de la leche de origen vegetal ensayados en esta investigación consisten en enzimas claramente termófilas (Campos y col., 1990), cuya actividad coagulante aumentaba con la temperatura hasta alcanzar valores relativamente elevados, desarrollándose una mayor coagulación a 70 °C en todos los casos. La capacidad de coagulación de la concentración de extracto OP se vio mucho más favorecida por el aumento de la temperatura que las demás especies de cardo. Así, a la concentración de 20 mg/mL el OP mostró una MCA 14,80 y 4,5 veces superior a la del CH ($p < 0,05$) a temperaturas de 80 y 85 °C, respectivamente. Además, la MCA para OP a 40mg/mL fue 1,23 y 1,64 veces superior a la de CH a las temperaturas de 60 y 70 °C ($p < 0,05$). A temperaturas superiores a 70 °C, se observó que la actividad de coagulación de la leche de los extractos disminuía en todas las especies aquí ensayadas, lo que indicaba la desnaturalización de las enzimas.

Se observó que la actividad coagulante de estos extractos responde a un amplio rango de valores de pH (5,0-8,0), alcanzando el valor máximo de MCA entre 5,0 y 5,5. Al aumentar el pH de la leche, se observó que la actividad coagulante de todos los extractos disminuía drásticamente. Esta evidencia era de esperar ya que se ha demostrado que las proteinasas aspárticas de la tribu Cardueae tienen una mayor actividad caseinolítica y de coagulación de la leche en rangos de pH ácidos (Brutti y col., 2012). Más concretamente, CC y CH presentaron una MCA máxima a una concentración de extracto de 40 mg/mL y un pH de 5,0, mientras que OP a un pH de 5,5.

En la primera fase del proceso de coagulación, una vez que la mayoría de los enlaces fenilalanina₁₀₅-metionina₁₀₆ se han escindido, los iones Ca^{2+} se combinan

con las fracciones de caseína para-kappa para formar coágulos firmes. Por esta razón, la adición de CaCl_2 a la leche reduce el tiempo de coagulación y permite la agregación de micelas de caseína (Nájera y col., 2003; Lagaude y col., 2004).

Como tendencia general, se observó un aumento de la MCA a mayores concentraciones de CaCl_2 para todos los extractos de cardo ensayados ($p < 0,001$). Todas las especies presentaron un valor máximo de MCA a 60 mM CaCl_2 . Al comparar las tres especies de cardo, la MCA de CH fue significativamente mayor que la de CC y OP ($p < 0,05$) en todas las concentraciones de CaCl_2 probadas. El rendimiento de las especies CH y OP se ve más positivamente afectado por la adición de altas concentraciones de CaCl_2 que la especie CC.

Se empleó la metodología de superficie de respuesta (RSM) para analizar el efecto simultáneo de la temperatura (T), el pH y la concentración de cloruro cálcico ($[\text{CaCl}_2]$) sobre el tiempo de coagulación (MCT) de la leche de oveja y de cabra, con la finalidad de maximizar la MCA de los extractos.

En cuanto a la leche de oveja, el efecto cuadrático de la variable T tuvo un impacto significativo ($p < 0,05$) en el MCT de CC y CH. Sin embargo, el efecto cuadrático de pH y $[\text{CaCl}_2]$ no afectó significativamente a la MCT de ninguno de los extractos de cardo. De las tres especies, únicamente el MCT de OP se vio afectado por la interacción entre pH y $[\text{CaCl}_2]$ y la interacción entre las variables T y $[\text{CaCl}_2]$. Por otra parte, el MCT no se vio afectado significativamente por el efecto interactivo de las variables T y pH.

Las condiciones en las que se alcanzó el MCT más bajo fueron las mismas para todos los coagulantes, siendo $T = 36^\circ\text{C}$, pH 5,5, y $[\text{CaCl}_2] = 6$ mM. Los niveles óptimos de los factores T y $[\text{CaCl}_2]$ fueron los más altos dentro de los rangos evaluados ($30\text{-}36^\circ\text{C}$) y (2-6 mM), respectivamente. Sin embargo, en el caso del pH, el nivel óptimo fue el más bajo dentro del rango explorado (5,5-6,5). Comparando la actividad de los coagulantes vegetales bajo estas condiciones óptimas, CC fue el extracto con mejor rendimiento en la coagulación de la leche, y CH mostró una actividad similar a CC. Por otro lado, OP obtuvo el mayor MCT, resultando en una menor actividad coagulante.

En cuanto a la leche de cabra, en el caso de los factores lineales, el MCT de todos los coagulantes ensayados se vio afectado significativamente ($p < 0,05$) por T y $[\text{CaCl}_2]$; en el caso del factor lineal pH, influyó significativamente en la actividad

de OP. El efecto cuadrático de la variable T tuvo un impacto significativo ($p < 0,05$) sobre la MCT de los tres coagulantes vegetales, CC, CH y OP. El MCT de OP se afectó significativamente por el efecto cuadrático de $[CaCl_2]$. Sin embargo, el efecto cuadrático del pH no afectó significativamente a la MCT de ninguno de los coagulantes. CC fue el único coagulante cuyo MCT se vio influenciado por la interacción entre los parámetros T y $[CaCl_2]$; OP fue el único coagulante cuya MCT se vio afectada significativamente por la interacción entre T y pH y por la interacción entre pH y $[CaCl_2]$. Comparando entre coagulantes vegetales bajo las mismas condiciones de ensayo, OP fue el coagulante que presentó mayor MCT en todos los casos, mientras que las MCT de CC y CH fueron similares.

Los resultados demuestran que un incremento en T y $[CaCl_2]$ disminuye el MCT de todos los coagulantes. Por otro lado, a valores de pH ácido, el MCT disminuye, sin embargo, se puede observar que este efecto es significativo sólo para OP. Para todos los coagulantes, los valores óptimos de T y $[CaCl_2]$ fueron los máximos estudiados, siendo $36^{\circ}C$ y $6mM$, respectivamente. En cuanto al pH, el valor óptimo de este factor para CC es el más bajo del rango explorado (5,5 - 6,5), mientras que para OP es el máximo de este rango; CH presentó un valor óptimo intermedio.

El efecto de la T y el pH durante el proceso de coagulación de la leche se ha estudiado en numerosas ocasiones con diferentes tipos de leche y coagulantes, y se ha llegado a la conclusión de que ambos factores influyen en las reacciones de hidrólisis y agregación enzimáticas (Castillo y col., 2000; Esteves y col., 2003a, 2003b). Se ha demostrado que tanto las proteasas de cuajo animal como las proteasas de las flores de cardo tienen carácter ácido, lo que también explica el aumento de su actividad al acercarse a condiciones ácidas (Anema y col., 2007; Ben Amira y col., 2017b). Además, el efecto del $CaCl_2$ sobre la agregación de las caseínas se ve potenciado por la disminución del pH debido al intercambio de Ca^{2+} y H^+ durante el proceso (Nájera y col., 2003; Zikiou y Zidoune, 2019; Ahmed y col., 2010).

Se realizó un estudio mediante RSM para comparar la MCA en leche de oveja y cabra del extracto de *Onopordum tauricum* procedente de flores silvestres (OTS) y cultivadas (OTC) y evaluar la intervención de los parámetros de T, pH y $[CaCl_2]$. La MCA se vio afectada tanto por el tipo de leche como por la procedencia de las flores (silvestres o cultivadas). En todos los ensayos, la temperatura óptima para la coagulación fue la más alta ($45^{\circ}C$) o cercana a la más alta ($43^{\circ}C$) en el intervalo

explorado (35-45 °C) y el valor óptimo de pH (5,0-5,5) fue el más bajo en el intervalo real estudiado (5,0-6,0). Coincidiendo con lo encontrado en los otros estudios realizados con CC, CH y OP. Las concentraciones óptimas de CaCl₂ fueron de 11-13 mM. Comparando entre OTS y OTC, bajo las condiciones óptimas de T = 43-45°C, pH 5,0-5,5, y [CaCl₂] = 11-13 mM, el extracto OTC fue 1,7 y 2,0 veces mayor que el extracto OTS, en leche de oveja y cabra respectivamente.

Se comparó la MCA de los extractos CC, CH y OP en leche de oveja y de cabra con la de un coagulante vegetal comercial de *Cynara cardunculus* (COM), un coagulante de quimosina obtenida por fermentación (FC), y un cuajo animal comercial (AR). Para ello se igualó la fuerza del coagulante a 50 IMCU/L de leche. En ambos tipos de leche, los coagulantes comerciales (AR, FC y COM) presentaron una mayor MCA que los obtenidos a partir de extractos liofilizados de flores de cardo (CC, CH y OP). Más concretamente, en el estudio con leche de oveja OP mostró una MCA un 95% inferior a la quimosina utilizada como referencia (FC), mientras que la actividad de CH y CC fue respectivamente un 50% y un 29% inferior a la MCA de FC. En cuanto a los coagulantes comerciales, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre AR y FC, mientras que la actividad de COM fue un 12% inferior a la de FC ($p < 0,05$). En leche de cabra se observó que la mayor MCA se obtuvo con el coagulante comercial 100% quimosina (FC), seguido de los coagulantes comerciales COM y AR, mientras que los extractos CC, CH y OP presentaron, respectivamente, una actividad 54, 75 y 96% inferior a FC.

6.1.2. Actividad proteolítica

Se evaluó el efecto de las diferentes especies de cardo sobre la actividad proteolítica (PA), al comparar entre las especies CC, CH y OP y tiempo de reacción a una concentración específica de extracto, surgieron diferencias significativas ($p < 0,001$).

Como se ha sugerido anteriormente, el aumento del tiempo de reacción y de la concentración de extracto incrementa la hidrólisis enzimática (Silva y Malcata, 2004; Bueno-Gavilá y col., 2020). Las especies CC y CH alcanzaron un valor máximo de PA a una concentración de extracto de 40 mg/mL y 60 minutos de reacción, respectivamente 52,49 U y 41,24 U. En cuanto a OP, el valor más alto de PA (34,18 U) se registró a una concentración de extracto de 40 mg/mL y 50 min de hidrólisis.

La ligera diferencia surgida en la actividad proteolítica de CC y CH podría deberse al hecho de que ambas especies tienen en común la aparición de una proteasa aspártica conocida como cardosina A; sin embargo, CC posee una segunda proteasa denominada cardosina B, que es aún más proteolítica (Esteves y col., 2002).

Comparando los valores obtenidos por las diferentes especies, las especies CC y CH mostraron una mejor relación MCA/PA que las especies OP en las condiciones ensayadas en este estudio. La relación MCA/PA es una medida importante que está relacionada con un mayor rendimiento y calidad del queso. Por lo tanto, la especie con la relación MCA/PA más alta es la más adecuada para su uso en la fabricación de queso (Liu y col., 2021).

En el estudio de la PA de los extractos OTS y OTC, se evaluó mediante RSM para evaluar el efecto de la interacción de las variables de T, pH y [CaCl₂]. La T y pH ejercieron un fuerte efecto cuadrático sobre la PA de OTC, mientras que el factor lineal de pH fue el único que afectó significativamente la PA de OTS. El pH óptimo resultó ser el menor (5,0) del rango estudiado. La T y [CaCl₂] más baja del rango explorado resultaron ser las condiciones óptimas para minimizar la PA, lo que pone de manifiesto la dificultad para establecer el mejor compromiso operativo en el primer paso de la fabricación del queso ya la mejor MCA se consigue con elevadas T y [CaCl₂]. Bajo estas condiciones óptimas, la PA del extracto OTS fue 1,5 veces mayor que el extracto OTC.

6.1.3. Propiedades reológicas y cinética de coagulación

Para evaluar las propiedades reológicas y la cinética de coagulación de los distintos coagulantes en leche de oveja y de cabra, se ajustó la dosis de coagulante para conseguir una fuerza de 50 IMCU/L de leche, por lo que no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) para los tiempos de coagulación (RCT) entre los diferentes coagulantes utilizados.

En cuanto a la leche de oveja, según el análisis de la tasa de cuajado (CFR), el coagulante comercial de quimosina obtenida por fermentación (FC) obtuvo una mayor CFR ($p < 0,05$) debido a su mayor especificidad (100% de quimosina), seguido por AR y CC, sin diferencias significativas entre ambos. El CFR de OP no difirió significativamente del de CH. Finalmente, el coagulante vegetal comercial

COM presentó una CFR significativamente ($p < 0,05$) inferior al resto de coagulantes.

El valor de firmeza en el punto de máxima velocidad (G'_{CFR}) fue significativamente ($p < 0,05$) superior para el coagulante COM, seguido de FC, AR y CC. Los valores más bajos se obtuvieron para los coagulantes vegetales liofilizados CH y OP. Tras 30 min de coagulación, se observaron de nuevo diferencias significativas ($p < 0,05$) en la firmeza de los geles (G'_F), siendo FC el coagulante con mayor firmeza, en concordancia con los resultados de CFR, seguido de AR y CC. El coagulante CH presentó valores intermedios que no difirieron significativamente de CC. Por el contrario, los valores significativamente más bajos ($p < 0,05$) fueron alcanzados por COM y OP.

Para entender mejor las diferencias entre los parámetros cinéticos CFR, G'_{CFR} y G'_F , se estudiaron los intervalos cinéticos t_0 , t_I y t_{II} . El coagulante comercial FC fue el primero en iniciar la agregación con un valor t_0 significativamente inferior al resto. Las mayores diferencias se encontraron con el coagulante comercial COM, que presentó un valor significativamente superior al resto tanto de t_0 como de t_I , así como un valor significativamente ($p < 0,05$) inferior de t_{II} , debido a una cinética de agregación más lenta como muestra su menor CFR. Esta menor velocidad, sumada a un mayor tiempo (t_0 y t_I) en iniciar la agregación, hace que el tiempo para alcanzar el CFR sea mucho mayor, y por tanto la firmeza a su velocidad máxima fue significativamente mayor que el resto de los coagulantes. Por otro lado, los extractos vegetales (CH, CC y OP) presentaron un espectro temporal similar a los coagulantes comerciales compuestos por quimosina, con valores de t_0 similares a AR y valores de t_I y t_{II} similares a AR y FC, excepto OP, que tiene un tiempo de agregación secundaria inferior a ellos.

La capacidad de retención de agua (WHC) del extracto vegetal OP no difirió significativamente de los demás coagulantes. Se pudo observar como las principales diferencias aparecieron entre los extractos vegetales CH y CC; estos coagulantes presentaron los valores más bajos de WHC, con respecto al coagulante FC que mostró los porcentajes más altos de WHC. No se encontraron diferencias significativas en el contenido de grasa en la composición del suero liberado por las diferentes cuajadas después de la centrifugación. Sin embargo, en lo que respecta a los compuestos nitrogenados, la proteína total perdida en el suero fue significativamente superior para los tres extractos vegetales (CC, CH y OP). El

coagulante FC fue el más eficaz en términos de retención de proteínas, siendo el que menos cantidad perdió a través del suero, mientras que AR y COM mostraron una pérdida moderada de proteínas.

En cuanto al nitrógeno no proteico en forma de urea, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los coagulantes. FC presentó la pérdida mínima, mientras que los extractos vegetales CC y OP presentaron los valores más altos de urea, seguidos del extracto CH. Los coagulantes comerciales AR y COM produjeron valores de pérdidas de urea entre FC y extractos vegetales liofilizados, encontrándose pérdidas de urea significativamente mayores al utilizar COM que AR.

El análisis de componentes principales (PC) se realizó con las variables significativas de los estudios cinéticos, el WHC y la composición del lactosuero. Dos componentes explican el 87,19% de la variabilidad de los coagulantes; el 51,02% corresponde al PC1, y el 36,17% al PC2. Mediante PC1, los coagulantes se separaron perfectamente según su origen. Con valores PC1 negativos, se encontraban los coagulantes vegetales, extractos CC, CH y OP y el coagulante comercial COM, debido a sus tiempos de agregación inicial (t_0) y primario (t_1). En el otro extremo, con valores positivos de PC1, se situaron FC y AR, coagulantes cuya enzima principal es la quimosina, que presentaron valores más altos de los parámetros cinéticos CFR y G'F.

PC2 separa los coagulantes comerciales de los extractos liofilizados. Por un lado, los extractos OP, CH y CC presentan valores positivos de PC2 debido a las mayores pérdidas de urea y proteína total en el suero obtenidas en el análisis WHC. Por otro lado, COM presentó valores PC2 negativos debido a su mayor valor G'CFR, que está relacionado con los intervalos t_0 y t_1 , y los coagulantes comerciales AR y FC también presentaron valores PC2 negativos debido a su capacidad de retención de agua o a las menores pérdidas de compuestos nitrogenados en el lactosuero. En conjunto, se obtuvieron 3 grupos bien diferenciados: CC, CH y OP, con mayores pérdidas de compuestos nitrogenados en el suero; COM, con una fase de agregación más lenta y débil; y AR y FC, con los mejores valores cinéticos de velocidad y firmeza final.

En cuanto a la leche de cabra, los valores más altos de CFR se obtuvieron con los coagulantes FC, AR y CC, seguidos de COM, mientras que CH y OP presentaron los valores más bajos de velocidad máxima sin diferencias

significativas entre ellos. La firmeza alcanzada por CH y OP en su punto de máxima velocidad presentó diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al resto de coagulantes, lo que se relaciona con su menor CFR. Esta correlación entre firmeza y CFR se mantiene a lo largo de la coagulación, donde los valores más bajos de G'_F se obtuvieron con los coagulantes vegetales CH y OP, seguidos de CC y COM. Esta similitud entre CH y OP muestra que OP puede ser una alternativa a aquellos coagulantes elaborados con flores de CH que se suelen utilizar en quesería como sustituto del tradicional CC (Ordiales y col., 2016). Los mayores valores de firmeza final se obtuvieron con FC, mientras que el valor de firmeza AR fue intermedio, no difiriendo significativamente ni con FC ni con COM y CC. El extracto OP se comportó de forma similar a los extractos vegetales CH y CC, mostrando menor CFR y menor firmeza final del gel que la quimosina.

Los valores más elevados del tiempo inicial de agregación (t_0) tras la hidrólisis se obtuvieron con el coagulante OP. A medida que progresa la agregación, la duración de la fase primaria (t_I) fue significativamente mayor ($p < 0,05$) para los coagulantes OP y COM en comparación con CC, AR y FC, mientras que el coagulante CH presentó valores intermedios. En la duración de la fase secundaria (t_{II}) las diferencias entre los coagulantes son menores y sólo se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los coagulantes FC y OP, mostrando el tiempo más largo y corto, respectivamente.

Los coagulantes vegetales CH, CC y OP tuvieron una WHC significativamente menor que el resto. Por otro lado, FC fue el coagulante con mayor WHC. AR presentó un WHC intermedio, similar a FC.

En cuanto a la composición del lactosuero, no se encontraron diferencias significativas en la cantidad de grasa, aunque sí en la concentración de compuestos nitrogenados. La mayor concentración tanto de proteína como de urea se obtuvo con los coagulantes vegetales CH y CC, seguidos de OP y COM, sin diferencias significativas entre ellos. Las menores pérdidas de proteína y urea se obtienen con los coagulantes AR y FC, sin diferencias significativas entre ellos. Comparando entre coagulantes vegetales, CC y CH presentaron mayores pérdidas de compuestos nitrogenados que OP, que demostró que OP presentó menor actividad proteolítica que CC y CH.

Tras el análisis de componentes principales (PC), se observó que un 86,3% de la variabilidad entre los diferentes coagulantes es explicada por dos componentes,

PC1 y PC2, que corresponden al 54,33% y 31,98% de la variabilidad, respectivamente.

El estudio de PC1 mostró que los coagulantes vegetales estaban asociados a valores negativos, mientras que los coagulantes comerciales estaban relacionados con el componente positivo. Tras un análisis más detallado de los resultados, se establecieron tres grupos: por un lado, CH y OP en el lado negativo de PC1 debido a sus mayores pérdidas de compuestos nitrogenados en el suero; en segundo lugar, AR y FC en el lado positivo de PC1, debido a los mayores valores cinéticos obtenidos (CFR , G'_{CFR} y G'_F) y a la mejor retención de agua de sus cuajadas (WHC); y en una situación intermedia COM y CC, con valores de PC1 próximos a cero.

En cuanto a PC2, se relacionó con los intervalos de tiempo en los que se divide la curva cinética, con especial incidencia en los coagulantes vegetales (COM, CC, CH y OP). CH y CC se agruparon en el extremo negativo de PC2 con mayores valores de tiempo en la zona de agregación secundaria (t_{II}), y OP y COM se agruparon con valores positivos de PC2 debido a sus mayores tiempos de inicio (t_0) y agregación primaria (t_1). FC y AR mostraron una situación intermedia, con valores de PC2 positivos pero próximos a cero.

Los resultados cinéticos muestran que los extractos de OP tienen una menor CFR y firmeza final del gel que la quimosina, comportándose de la misma manera que los extractos vegetales de CC y CH, que han sido ampliamente estudiados (Esteves y col., 2002, 2003a, 2003b). Lo que demuestra que OP puede ser una alternativa a los coagulantes vegetales comúnmente utilizados en la elaboración de queso extraídos de las flores de la especie de cardo *Cynara cardunculus* L. (Jacob y col., 2011). Ben Amira y col. (2017a) encontraron que un extracto de CC mostró valores más bajos de WHC que la quimosina y lo atribuyeron a las diferencias entre los coagulantes en la temperatura de coagulación óptima de la leche. En cuanto a la composición del suero, las mayores pérdidas de compuestos nitrogenados al utilizar extractos vegetales se deben a su mayor actividad proteolítica y están relacionadas con un menor rendimiento quesero (Jacob y col., 2010). Las diferencias en el genotipo y método de producción de los coagulantes CC y COM, ambos extractos vegetales de *Cynara cardunculus* L., pueden explicar las diferencias significativas encontradas entre estos dos coagulantes (Gomes y col., 2019).

6.2. INFLUENCIA DEL TIPO DE COAGULANTE SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS COMPOSICIONALES Y SENSORIALES DEL QUESO MURCIA AL VINO

Se estudió la influencia del tipo de coagulante en los parámetros fisicoquímicos del queso. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el tipo de coagulantes en los valores de pH y contenido de extracto seco; en cuanto al pH, los quesos elaborados con AR, COM y AR/OP presentaron valores más altos de pH que los elaborados con CC y CH; en cuanto al extracto seco, el contenido fue mayor en quesos elaborados con CC y CH, mientras que el valor mínimo se observó en el queso elaborado con AR/OP. Tejada y col. (2008b) encontraron mayores valores de materia seca y en los quesos elaborados con coagulantes vegetales que en los quesos elaborados con cuajo animal atribuyéndolo a una mayor proteólisis, sin embargo, no encontraron diferencias en el pH a los 30 días de maduración. En cuanto al contenido en cenizas, el efecto del tipo de coagulante fue significativo, siendo el queso elaborado con CH el que presentó un menor contenido en cenizas en comparación con los quesos elaborados con AR y AR/OP. Estos resultados coinciden con los reportados por Tejada y col. (2008b), quienes encontraron menor contenido de cenizas en los quesos elaborados con coagulante vegetal que en los elaborados con cuajo animal. El contenido en proteína se vio significativamente afectado por el tipo de coagulante utilizado en la elaboración del queso, siendo mayor en los quesos elaborados con los coagulantes comerciales AR y COM y con AR/OP que en los elaborados con los coagulantes experimentales CH y CC. En un estudio en el que se compararon quesos Murcia al vino elaborados con coagulante vegetal y cuajo animal, no se encontraron diferencias significativas en el contenido proteico (Tejada y col., 2008b).

No se encontraron diferencias significativas en los parámetros A_w , lactosa, NaCl y grasa.

. Se observó que el tipo de coagulante afectaba significativamente a las cargas de Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae y levaduras; sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los recuentos viables de las muestras de queso para los demás grupos microbianos investigados, excluyendo así cualquier influencia del tipo de cuajo en sus cargas.

Se estableció una correlación negativa entre el crecimiento de aerobios mesófilos totales y presuntos lactococos mesófilos con los valores de pH,

mostrando que los quesos elaborados con CH tenían recuentos más altos de estos grupos microbianos y valores de pH más bajos. Una mayor carga de lactococos está relacionada con la adición de bacterias lácticas como cultivos iniciadores en la elaboración del queso Murcia al vino y con una menor carga de lactobacilos, ya que el metabolismo de estos últimos tiene una menor tasa metabólica, limitando su capacidad de biosíntesis (Morishita y col., 1981; Ferrazza y col., 2004; García y col., 2014). Los mayores niveles de Enterobacteriaceae y coliformes en quesos elaborados con AR y COM sugieren que su uso conlleva una contaminación microbiana adicional de la leche inicial (Vioque y col., 2000; Gómez y col., 2001; Tejada y Fernández-Salguero, 2003) y que la liofilización de los extractos de cardo disminuye la carga microbiana. Sin embargo, las Enterobacteriaceae pertenecen a un grupo muy heterogéneo y en el queso se han encontrado tanto efectos negativos (causantes de infecciones humanas) como biotecnológicos (cultivos iniciadores) (Rampanti y col., 2023). Los valores más altos de Pseudomonadaceae se encontraron en quesos elaborados con coagulantes acuosos COM y CC, lo que puede deberse a una contaminación causada principalmente por factores que intervienen en el proceso de producción. Sin embargo, su identificación merece un análisis más detallado, ya que los resultados obtenidos a partir del recuento de viables deberían confirmarse mediante análisis basados en el ADN (Rampanti y col., 2023). Los recuentos más bajos de levaduras se encontraron en las muestras de queso elaboradas con CH; esto puede atribuirse al efecto de la liofilización sobre la reducción de la carga microbiana del coagulante (Tejada y col., 2008a).

Todos los parámetros de textura medidos mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los distintos coagulantes utilizados. Los quesos producidos con CC presentaron los valores de dureza más bajos, mientras que los producidos con COM presentaron los valores más altos ($p < 0,05$). Estas diferencias entre dos coagulantes elaborados a partir de la misma especie de cardo podrían deberse a diferencias en el genotipo, la producción y el método de obtención del extracto. Estos resultados concuerdan con los encontrados por Tejada y col. (2007), quienes demuestran que la dureza del queso de oveja elaborado con un extracto acuoso producido con *Cynara cardunculus* es superior a la dureza del mismo tipo de queso elaborado con un coagulante liofilizado de *Cynara cardunculus*. Por otro lado, los quesos con CH presentaron valores de dureza similares a los producidos con coagulantes de cuajo animal (AR y AR/OP). La dureza está correlacionada

negativamente con la capacidad proteolítica de los extractos (Tejada y col., 2007) y cuanto mayor es la capacidad proteolítica del extracto, menor es la dureza del queso.

Los valores de cohesividad, elasticidad y adhesividad fueron similares a los demostrados por García y col. (2014) en quesos de vino de Murcia elaborados con un extracto acuoso de *Cynara cardunculus*. En particular, los quesos elaborados con CH presentaron valores más altos de elasticidad y adhesividad, mientras que los quesos elaborados con CC presentaron valores mínimos. Los quesos con AR/OP y AR presentaron valores intermedios para ambos parámetros. Lo contrario ocurrió con el parámetro cohesividad, para el que los quesos con COM y CC presentaron valores superiores a los quesos con CH, AR/OP y AR.

En cuanto a los atributos externos, todos los quesos mostraron un aspecto externo aceptable sin grietas. En cuanto a la forma de la corteza, los quesos elaborados con AR y AR/OP puntuaron significativamente más alto ($p < 0,05$) que el resto, mientras que el queso con la puntuación más baja fue COM. En cuanto a la firmeza de la corteza, los quesos CC y CH presentaron los valores más bajos ($p < 0,05$).

Se puede observar cómo el tipo de coagulante afectó significativamente a los atributos relacionados con el color de la pasta. La intensidad de color fue mayor en los quesos elaborados con COM y CC, mientras que la menor intensidad la presentaron AR y CH. Las muestras de queso AR/OP mostraron valores intermedios de intensidad de color de la pasta. Este parámetro se ha relacionado con una mayor proteólisis (Tejada y col., 2007).

Se encontraron diferencias significativas en el efecto del tipo de coagulante sobre los atributos de olor del queso ($p < 0,05$), excepto para los atributos establo y mohoso, ya que no hubo presencia de estos olores en ninguna de las muestras de queso. Los quesos AR y CH presentaron los valores más altos de los atributos de olor láctico y mantecoso ($p < 0,05$). Los procesos enzimáticos que tienen lugar durante la elaboración y maduración del queso generan un gran número de compuestos que confieren características sensoriales únicas al queso (Carbonell y col., 2002). Los estudios indican que los coagulantes vegetales promueven mayores niveles de aminoácidos como resultado de una proteólisis más intensa (Abellán y col., 2012a). El olor a mantequilla está relacionado con el metabolismo de la grasa y la formación de ácidos grasos, sin embargo, Tejada y col. (2008b) no encontraron

diferencias significativas en el contenido de ácidos grasos libres en muestras de queso Murcia al vino preparadas con cuajo animal y coagulante vegetal.

Se encontraron diferencias significativas en el efecto del tipo de coagulante sobre todos los parámetros de textura del queso evaluados ($p < 0,05$). Los quesos elaborados con CC mostraron los valores más bajos de elasticidad, firmeza, masticabilidad y microestructura. Por el contrario, los quesos CH presentaron los valores más altos de firmeza, masticabilidad y microestructura, aunque las puntuaciones de elasticidad fueron muy similares a las de los quesos CC. Los quesos elaborados con coagulantes comerciales, tanto vegetales como animales (AR y COM) presentaron valores similares entre ellos y superiores a los de los quesos CC en todos los parámetros. Otro estudio que evaluó el efecto del cuajo animal y de un coagulante vegetal de *Cynara cardunculus* sobre las características sensoriales del queso de Murcia con vino (Tejada y col., 2006) encontró que los quesos elaborados con cuajo animal tenían mayor dureza y granularidad y menor cremosidad que los elaborados con el coagulante vegetal, atribuyendo este resultado a la mayor proteólisis de los coagulantes vegetales en comparación con el cuajo animal.

En cuanto al sabor del queso, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el tipo de coagulante en todos los parámetros, excepto en el amargor. Los atributos picante, persistencia y amargor fueron mayores en los quesos elaborados con coagulantes vegetales (COM, CC y CH), incluido el coagulante mixto (AR/OP), que en los quesos elaborados con cuajo 100% animal (AR). Esta tendencia es similar en el caso del atributo sabor agrio, para el que los quesos CC, CH y AR/OP mostraron niveles más altos de este sabor que los quesos AR; sin embargo, el queso COM recibió la puntuación más baja para este parámetro. Según Tejada y col. (2006), la intensidad del sabor y del gusto amargo está relacionada con la proteólisis, siendo mayor en los quesos elaborados con coagulantes vegetales.

6.3. INFLUENCIA DEL TIPO DE COAGULANTE SOBRE LA PROTEÓLISIS DEL QUESO MURCIA AL VINO

El tipo de coagulante afectó significativamente ($p < 0,05$) al contenido en NNP y NS de los quesos. En ambas fracciones, los quesos elaborados con coagulantes vegetales (OP, CC, COM y CH) presentaron valores significativamente superiores

a los elaborados con AR y OP/AR. El queso OP presentó los valores más altos de las fracciones nitrogenadas aquí evaluadas. Los resultados de este estudio concuerdan con los reportados por otros autores que también encontraron mayor contenido de NNP y NS en quesos de cabra elaborados con coagulantes vegetales frente a los elaborados con cuajo animal (Abellán y col., 2012b; Pino y col., 2009).

La fracción NS se relaciona como uno de los factores de la proteólisis primaria que se produce con la ruptura inicial de las caseínas producidas por el coagulante residual y la plasmina, mientras que la fracción NNP es un indicador de la proteólisis secundaria generada para la hidrólisis de las proteinasas y peptidasas de las bacterias lácticas (Rako y col., 2022). En este sentido, tal y como indican otros autores, se ha demostrado que las proteasas aspárticas vegetales procedentes de los cardos son más proteolíticas que el cuajo animal, generando una mayor cantidad de péptidos grandes y medianos tras la hidrólisis primaria, que sirven de sustrato para las bacterias lácticas en la hidrólisis secundaria, generando una mayor cantidad de péptidos pequeños y aminoácidos libres. (Galán y col., 2008; Tejada y col., 2008c; Tejada y Fernández-Salguero, 2003). Por otro lado, las diferencias en la proteólisis entre los distintos coagulantes vegetales no sólo se deben a la diferencia en su capacidad caseinolítica, sino que también están influenciadas por la cantidad de coagulante añadido. (Galán y col., 2008; Bueno-Gavilá y col., 2020). Así, la mayor proteólisis en quesos elaborados con OP frente a quesos elaborados con otras proteasas aspárticas vegetales puede deberse a la diferencia en la cantidad de coagulante utilizado en la elaboración del queso.

El tipo de coagulante afectó significativamente ($p < 0,05$) al contenido en aminoácidos libres de los quesos. Sin embargo, no existe un patrón común en todos los coagulantes vegetales, probablemente debido a las diferencias en la especificidad de cada proteasa en la hidrólisis de caseínas y péptidos. Además, la acción de las bacterias lácticas es fundamental en la descomposición de las caseínas, siendo el principal factor en la producción de aminoácidos libres en el queso. Por lo tanto, las diferencias en el contenido de aminoácidos libres se atribuyen principalmente a ambos factores; el tipo de coagulante y la carga microbiana del queso (Abellán y col., 2012b). Sin embargo, dos aminoácidos que demostraron estar altamente relacionados con la proteólisis son Tyr y Trp (Fernández-Salguero y col., 2002). En consecuencia, los coagulantes elaborados con flores de *Cynara cardunculus* (COM y CC) presentaron los valores más altos de estos aminoácidos ($p < 0,05$).

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el contenido de péptidos Ho y Hi y en la relación Ho/Hi. El contenido en péptidos Ho fue mayor en los quesos elaborados con coagulantes vegetales (OP, CC, COM y CH) que con AR y AR/OP. En un estudio en el que se comparó el perfil peptídico de quesos de cabra elaborados con cuajo animal y un extracto de CC, concluyeron que los quesos elaborados con CC presentaban un mayor contenido en péptidos Ho y una mayor relación Ho/Hi, atribuyéndolo a que las proteinasas de CC hidrolizan los enlaces peptídicos de las zonas hidrofóbicas de las caseínas (Pino y col., 2009).

6.4. INFLUENCIA DEL TIPO DE COAGULANTE Y DE LA INFORMACIÓN SOBRE LA ACEPTACIÓN DEL PRODUCTO FINAL POR PARTE DE LOS CONSUMIDORES

Las puntuaciones medias de los consumidores para la aceptabilidad percibida expresada en condiciones ciegas fueron significativamente superiores para los quesos elaborados con cuajo animal (AR) que para los quesos elaborados con COM coagulante vegetal comercial (COM) ($p < 0,05$). Mientras que para la aceptabilidad esperada no se encontraron diferencias significativas entre los dos tipos de quesos ($p > 0,05$). Tanto en la prueba de vinculación ciega como en la prueba de aceptabilidad esperada, las puntuaciones de los consumidores fueron superiores a 7 (me gusta ligeramente) para el queso AR y superiores a 6 (ni me gusta ni me disgusta) para el queso COM.

El efecto de la información modificó la aceptación general del queso elaborado con COM siendo significativamente inferior ($p < 0,05$) la valoración en el test ciego antes de recibir información relativa a la diferencia entre cuajo animal y coagulante vegetal. Este resultado puede deberse al hecho de que factores como los ingredientes de origen ético, la conciencia social y las consideraciones medioambientales contribuyen en gran medida a la selección de productos alimenticios, así como al creciente nicho de mercado de los vegetarianos y los alimentos Kosher y Halal, que han aumentado el interés en la búsqueda de coagulantes vegetales para sustituir el uso de cuajo animal en la producción de queso (Colombo y col., 2021). Estos resultados son consistentes con estudios anteriores que confirman que aspectos como la salubridad, la naturalidad, los aspectos éticos, etc., deben comunicarse al consumidor para que influyan en la

aceptabilidad del producto, ya que no pueden percibirse o experimentarse directamente antes o durante el consumo (Grunert y col., 2004).

6.5. INFLUENCIA DE LA ESPECIE DE CARDO SOBRE LA BIOACTIVIDAD DE LOS PÉPTIDOS DE LOS HIDROLIZADOS DE CASEÍNA BOVINA

Los péptidos presentes en los hidrolizados se secuenciaron por LC-MS/MS. El número de secuencias de péptidos identificadas en las muestras de CH, CC y OP fue de 13.343, 11.279 y 9.153, respectivamente, siendo el hidrolizado de CH la muestra con mayor número de péptidos, seguida de CC y OP con la menor cantidad.

Para determinar la bioactividad de las secuencias peptídicas identificadas en los diferentes hidrolizados de caseína, estas secuencias fueron buscadas en la base de datos BIOPEP. Como resultado, se detectaron 2 tipos de biopéptidos: aquellos en su forma bioactiva en los hidrolizados de caseína; y los potenciales, que contienen secuencias bioactivas dentro de su estructura primaria. Según los péptidos encontrados en su forma bioactiva, se encontraron 20, 15 y 5 secuencias peptídicas en los hidrolizados de CH, CC y OP, respectivamente. Se encontraron cuatro secuencias únicas en los hidrolizados de CC que no se encontraron en los hidrolizados de CH y OP, y nueve secuencias se encontraron sólo en el hidrolizado de CH, que no se encontraron en el resto. Las cinco secuencias de péptidos bioactivos de OP también se encontraron en los hidrolizados de las otras especies. El hidrolizado de CH presentó el mayor número de secuencias de péptidos bioactivos. Algunas de las secuencias aquí reportadas también fueron encontradas por Bueno-Gavilá y col. (2019) en una investigación similar en la que se evaluó la bioactividad de péptidos de un hidrolizado de caseína bovina de la especie de cardo *Cynara scolymus*. Para la cuantificación de los péptidos bioactivos, se consideraron las coincidencias espectrales peptídicas (PSM) y se evaluó la presencia de secuencias bioactivas en su estructura primaria observándose que los hidrolizados de caseína de OP tienen una mayor cantidad de péptidos bioactivos que presentan actividad como estimulante, antiamnésico, antidiabético, antitrombótico, agonista opioide, etc. Los hidrolizados de caseína de CC mostraron una mayor cantidad de péptidos bioactivos osteoanabólicos, antiapoptóticos, inhibidores de la lipoxigenasa, antiinflamatorios, antioxidantes, hipolipidémicos,

hemolíticos, etc. La bioactividad de los péptidos de los hidrolizados de CH se relacionó con antagonistas opioides, inhibidores de la alfa-glucosidasa, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), hipotensores, anticancerígenos, antivirales, antibacterianos e inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV.

Los resultados de los péptidos identificados que tienen bioactividad potencial por contener secuencias bioactivas dentro de sus estructuras primarias muestran que todos los hidrolizados de caseína mostraron un gran potencial como fuente de este tipo de precursores. Los precursores peptídicos de los hidrolizados de OP ejercen, por ejemplo, potenciales actividades antidiabéticas, antifúngicas, inmunoestimuladoras e inmunomoduladoras, antitrombóticas e inhibidoras de la secreción de insulina. En el caso de los precursores peptídicos de CH, exhiben actividad hipotensora, hemolítica, antiviral, antioxidante, anticancerígena, antibacteriana, antiapoptótica y agonista opiode. Los CC demostraron ser precursores de actividades como hipolipidémica, inhibidora de la HMG-CoA reductasa, inhibidora de la CaMPDE, inhibidora de la BChE y antiinflamatoria.

VII – CONCLUSIONES

VII - CONCLUSIONES

1. La actividad coagulante de los extractos procedentes de las flores de cardo de las especies *Cynara humilis*, *Onopordum platylepis* y *Onopordum tauricum*, mantiene una relación positiva con la concentración de extracto, la temperatura y la concentración de cloruro cálcico, y una relación negativa con el pH. Todas las nuevas especies de cardo evaluadas manifestaron una actividad proteolítica comparable a las de la especie *Cynara cardunculus* L., demostrando la posibilidad de su utilización en la elaboración de quesos.
2. Los extractos de *Onopordum tauricum* procedentes de flores silvestres y cultivadas mostraron condiciones óptimas para la coagulación de leche de oveja y cabra dentro de los rangos $T = 43-45\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 5.0-5.5$, $[\text{CaCl}_2] = 11-13\text{ mM}$.
3. Las condiciones de concentración de extracto, temperatura, pH y concentración de cloruro cálcico para alcanzar los valores máximos de actividad coagulante en leche de vaca de los extractos de *Cynara humilis* y *Onopordum platylepis* son, respectivamente, $[\text{extracto}] = 40\text{mg/mL}$, $T = 70^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 5.0$, $[\text{CaCl}_2] = 60\text{ mM}$ y $[\text{extracto}] = 40\text{mg/mL}$, $T = 70^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 5.5$, $[\text{CaCl}_2] = 60\text{ mM}$. Las condiciones óptimas de temperatura, pH, y concentración de cloruro cálcico para minimizar el tiempo de coagulación de la leche de oveja son $T = 36^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 5.5$, $[\text{CaCl}_2] = 6\text{ mM}$ para ambas especies. En leche de cabra las condiciones óptimas de *Cynara humilis* son $T = 36^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 6.0$, $[\text{CaCl}_2] = 6\text{ mM}$ y de *Onopordum platylepis* son $T = 36^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 6.5$, $[\text{CaCl}_2] = 6\text{ mM}$.
4. Se estableció un modelo de predicción que permite conocer previamente el tiempo de coagulación fijando unas condiciones de temperatura, pH y concentración de cloruro cálcico, pudiéndose también fijar el tiempo de coagulación deseado para conseguir y determinar el nivel de alguna de las variables involucradas.

5. La cinética de coagulación de *Onopordum platylepis* fue similar a la presentada por *Cynara humilis* y *Cynara cardunculus*, demostrando su potencial para la producción de quesos de cabra y oveja en los que se requiere una proteólisis extensa. Las pérdidas de componentes nitrogenados tras la coagulación de *Onopordum platylepis* fueron superiores a las de los coagulantes a base de quimosina.
6. Se observan diferencias sobre los recuentos microbianos de enterobacterias y levaduras en los quesos elaborados con *Cynara cardunculus* y *Cynara humilis* debidas a las diferencias tecnológicas en el proceso de elaboración de cada extracto.
7. El tipo de coagulante afectó significativamente a las propiedades sensoriales del queso de Murcia al vino. En los quesos elaborados con *Cynara humilis* se observó una mayor masticabilidad, firmeza, microestructura y un olor a mantequilla más intenso. Los quesos elaborados con *Cynara humilis* y el coagulante mezcla de cuajo animal y *Onopordum platylepis* presentaron las mayores puntuaciones de sabor ácido y una persistencia del sabor mayor que los quesos elaborados con cuajo animal pero menor que los quesos elaborados con los diferentes extractos de *Cynara cardunculus*.
8. El efecto de la información sobre el tipo de coagulante empleado y su procedencia afectó en gran medida a la aceptación por parte de los consumidores del queso de Murcia al vino elaborado con coagulante vegetal.
9. La proteólisis de los quesos elaborados con coagulante vegetal fue mayor que en los elaborados con cuajo animal, siendo más elevada en los elaborados con *Onopordum platylepis* observándose mayor contenido en NNP, NS, y péptidos hidrófobos.
10. En los hidrolizados de caseína bovina obtenidos con los extractos *Cynara humilis* y *Onopordum platylepis* se encontraron 20 y 5 secuencias de péptidos con bioactividad, respectivamente, demostrando actividades comunes como inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV, inhibidores de la ECA, antioxidante, antimicrobiana, antiviral y hemolítica. También se

identificaron péptidos que poseen secuencias bioactivas con actividad putativa en función de la especie.

VIII - LIMITACIONES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

VIII - LIMITACIONES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Una de las principales limitaciones de esta investigación es la variabilidad planta-planta, lo que influye en la composición del coagulante vegetal y que es consecuencia de diferencias agronómicas por el tipo de suelo y condiciones climáticas, lo que causa a su vez variaciones en las características composicionales y sensoriales de un mismo tipo de queso. A pesar de que la liofilización del extracto es una opción que permite homogeneizar el extracto acuoso lo que disminuye esta variabilidad entre plantas y permite la producción de lotes más homogéneos, es una solución costosa y que funciona para la producción de lotes en un mismo año, ya que al año siguiente se recogerían nuevamente flores silvestres que podrían ser morfológicamente y químicamente diferentes a las del año anterior, y por lo tanto conseguir un queso con diferencias significativas en sus propiedades fisicoquímicas y sensoriales con respecto al mismo tipo de queso del año anterior. Aunque otros colaboradores de esta investigación realizaron cultivos controlados de las especies de cardo silvestres recogidas, no se evaluaron diferentes ecotipos con la finalidad de seleccionar al más adecuado para su explotación en la producción de quesos.

Otra de las limitaciones relacionadas con esta investigación es la imposibilidad de conocer el alcance de los efectos beneficiosos para la salud de los péptidos bioactivos generados tras la digestión de los quesos. Se sabe que los péptidos bioactivos se liberan tras la digestión y deben ser absorbidos por el tracto gastrointestinal y llegar a aquellos tejidos en los que deben ejercer su acción en cantidades suficientes para tener un efecto biológico. A pesar de que se han identificado secuencias de péptidos con bioactividad en los hidrolizados de caseína a partir de la hidrólisis enzimática mediante las especies de cardo estudiadas, no se puede saber si llegarían a ejercer estos efectos beneficiosos hasta que no se haga un estudio de biodisponibilidad *in vitro* e *in vivo*.

Para superar estas limitaciones se plantean las siguientes líneas de investigación:

-
- Identificar el ecotipo con mejores propiedades tecnológicas y funcionales e implementar prácticas agronómicas sostenibles para el cultivo de dicha variedad de planta para de esta forma conseguir un cultivo con menor variabilidad planta-planta y asegurar una cantidad de flores suficiente para que la producción de quesos cubra la demanda, disminuyendo también la variabilidad entre un mismo tipo de queso entre lotes y año tras año.
 - Evaluación de la biodisponibilidad de los péptidos tras la digestión, su secuenciación y la determinación de su bioactividad mediante ensayos in vitro e in vivo con la finalidad de determinar aquellos péptidos que son capaces de resistir la digestión gastrointestinal, son absorbidos en cantidades fisiológicamente activas, y alcanzan la circulación sanguínea hasta los tejidos en los que va a ejercer su acción biológica.

IX - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

IX - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abellán, A., Cayuela, J.M., Pino, A., Martínez-Cachá, A., Salazar, E. & Tejada, L. (2012a). Free amino acid content of goat's milk cheese made with animal rennet and plant coagulant. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(8), 1657-1664.
- Abellán, A., Tejada, L., Pérez-Garrido, A., Salazar, E., Martínez-Cachá, A. & Cayuela, J.M. (2012b). Effects of cheese size on composition and proteolysis in goat's milk cheese. *Acta Alimentaria*, 41(2), 180-189.
- AENOR (1979). Análisis sensorial. Guía para la instalación de una sala de cata. Norma española UNE 87004. En Análisis sensorial. Tomo 1- Alimentación (pp. 57-64). Madrid: Asociación Española de Normalización y Certificación.
- AENOR (2014). Sensory Analysis. General guidelines for the selection, training and monitoring of selected assessors and expert sensory assessors. (UNE-EN ISO 8586:2014). Madrid: Asociación Española de Normalización y Certificación.
- 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(8), 1352–1359.
- Ahmed, I.A.M., Babiker, E.E., & Mori, N. (2010). pH stability and influence of salts on activity of a milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* seeds and its enzymatic action on bovine caseins. *LWT-Food Science and Technology*, 43(5), 759-764.
- Alavi, F., & Momen, S. (2020). Aspartic proteases from thistle flowers: Traditional coagulants used in the modern cheese industry. *International Dairy Journal*, 107, 104709.
- Alavi, F., & Momen, S. (2020). Aspartic Proteases from Thistle Flowers: Traditional coagulants used in the modern cheese industry. *International Dairy Journal*, 107, 104709.

- Anema, S.G., Lee, S.K., & Klostermeyer, H. (2007). Effect of pH at heat treatment on the hydrolysis of κ -casein and the gelation of skim milk by chymosin. *LWT-Food Science and Technology*, 40(1), 99-106.
- Anzaldúa-Morales, A. (1994). *La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y en la práctica*. Zaragoza: Ed. Acribia.
- AOAC. AOAC Official Method 991.25. (2002). Calcium, Magnesium, and Phosphorus in Cheese, Atomic Absorption Spectrophotometric and Colorimetric Method In Official Methods of Analysis, 17th ed.; AOAC International: Arlington, VA, USA.
- Arango, O., Trujillo, A.J., & Castillo, M. (2015). Predicting coagulation and syneresis parameters of milk gels when inulin is added as fat substitute using infrared light backscatter. *Journal of Food Engineering*, 157, 63-69.
- Asociación Española de Normalización. (2018a). Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección inmunoenzimática de enterotoxina estafilocócica en los productos alimenticios (UNE-EN ISO 19020:2017). UNE, Madrid, España.
- Asociación Española de Normalización. (2018b). Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes* y de *Listeria spp.* Parte 1: Método de detección (UNE-EN ISO 11290-1:2017). UNE, Madrid, España.
- Asociación Española de Normalización. (2021). Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección, enumeración y serotipado de *Salmonella*. Parte 1: Detección de *Salmonella spp.* Modificación 1: Ampliación del rango de temperaturas de incubación, modificación del estados del Anexo D y corrección de la composición de los medios MSR_V y SC (UNE-EN ISO 6579-1:2017/A1:2021). UNE, Madrid, España.
- Babín, F.A. (2006). Encefalopatía espongiiforme bovina: el "mal de las vacas locas". *Revista de Administración Sanitaria Siglo XXI*, 4(4), 655-673.
- Bande-De León, C., Buendía-Moreno, L., Abellán, A., Manzi, P., Al Mohandes Dridi, B., Essaidi, I., Aquilanti, L., and Tejada, L. (2023). Clotting and Proteolytic Activity of Freeze-Dried Crude Extracts Obtained from Wild

- Thistles *Cynara humilis* L. and *Onopordum platylepis* Murb. *Foods* 12(12), 2325.
- Barbosa, M. (1983). "Cardo" (*Cynara cardunculus* L) as vegetable rennet. *Boletim do Departamento de Tecnologia e Indústria Alimentar*, 58(45), 1-11.
- Barracosa, P., Rosa, N., Barros, M., & Pires, E. (2018). Selected cardoon (*Cynara cardunculus* L.) genotypes suitable for PDO cheeses in Mediterranean regions. *Chemistry & Biodiversity*, 15(7), e1800110.
- Bastian, E.D., & Brown, R.J. (1996). Plasmin in milk and dairy products: an update. *International Dairy Journal*, 6(5), 435-457.
- Bauer, R., Hansen, M. B., Hansen, S., Øgdenal, L., Lomholt, S. B., Qvist, K. B. & Horne, D. S. (1995). The structure of casein aggregates during renneting studied by indirect Fourier transformation and inverse Laplace transformation of static and Dynamic light scattering data, respectively. *Journal of Chemical Physics*, 103, 2725-2737.
- Beltrán-Espinoza, J.A., Domínguez-Lujan, B., Gutiérrez-Méndez, N., Chávez-Garay, D. R., Nájera-Domínguez, C., & Leal-Ramos, M.Y. (2021). The impact of chymosin and plant-derived proteases on the acid-induced gelation of milk. *International Journal of Dairy Technology*, 74(2), 297-306.
- Ben Amira, A., Besbes, S., Attia, H., Blecker, C. (2017a) Milk-clotting properties of plant rennets and their enzymatic, rheological, and sensory role in cheese making: A review.
- Ben Amira, A., Blecker, C., Richel, A., Arias, A.A., Fickers, P., Francis, F., Besbes, S., & Attia, H. (2018). Influence of the ripening stage and the lyophilization of wild cardoon flowers on their chemical composition, enzymatic activities of extracts and technological properties of cheese curds. *Food chemistry*, 245, 919-925.
- Ben Amira, A., Makhlouf, I., Petrut, R.F., Francis, F., Bauwens, J., Attia, H., Besbes, S., & Blecker, C. (2017c). Effect of extraction pH on techno-functional properties of crude extracts from wild cardoon (*Cynara cardunculus* L.) flowers. *Food chemistry*, 225, 258-266.
- Ben Amira, A., Mokni, A., Yaich, H., Chaabouni, M., Besbes, S., Blecker, C., & Attia, H. (2017b). Technological properties of milk gels produced by chymosin

- and wild cardoon rennet optimized by response surface methodology. *Food chemistry*, 237, 150-158.
- Bencini, R. (2002). Factors affecting the clotting properties of sheep milk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(7), 705-719.
- Benkahoul, M., Benchiheb, M., Bellil, I., Khelifi, D., & Maza, A. (2016). M. Physical and chemical properties of the acid protease from *Onopordum acanthium*: Comparison between electrophoresis and HPLC of degradation casein profiles. *African Journal of Biotechnology*, 15(9), 331-340.
- Bernardo, A., (1991). Aspectos fundamentales para la elaboración industrial de quesos artesanales. Nuevos métodos tecnológicos para productos lácteos. Coruña: Ed. Venus. p. 127-138.
- Bersuder, P., Hole, M. & Smith, G. (1998). Antioxidants from heated histidineglucose model system. I: Investigation of the antioxidant role of histidine and isolation of antioxidants by high-performance liquid chromatography. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 75(2), 181-187.
- Biel, W., Witkowicz, R., Piątkowska, E., & Podsiadło, C. (2020). Proximate composition, minerals and antioxidant activity of artichoke leaf extracts. *Biological trace element research*, 194, 589-595.
- B.O.E. *Boletín Oficial del Estado* (BOE-A-1988-1153). 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. (BOE, número 17, de 20 de enero de 1988)
- Bord, C., Lenoir, L., Schmidt-Filgueras, R., Benoit, J., Dechambre, G., & Chassard, C. (2021). Discrimination and sensory characterization of Protected Designation of Origin Salers- and Cantal-type cheeses: An approach using descriptive analysis and consumer insights by check-all-that-apply questions. *Journal of Sensory Studies*, 36(6), e12698.
- Bouazzi, S., El Mokni, R., Nakbi, H., Dhaouadi, H., Joshi, R.K., & Hammami, S. (2020). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils and hexane extract of *Onopordum arenarium* from Tunisia. *Journal of Chromatographic Science*, 58(4), 287-293.

- Boutoial, K., Ferrandini, E., Rovira, S., García, V., & López, M.B. (2013). Effect of feeding goats with rosemary (*Rosmarinus officinalis* spp.) by-product on milk and cheese properties. *Small Ruminant Research*, 112(1-3), 147-153.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brutti, C.B., Pardo, M.F., Caffini, N.O., & Natalucci, C.L. (2012). *Onopordum acanthium* L. (Asteraceae) flowers as coagulating agent for cheesemaking. *LWT-Food Science and Technology*, 45(2), 172-179.
- Bueno-Gavilá, E., Abellán, A., Bermejo, M.S., Salazar, E., Cayuela, J.M., Prieto-Merino, D. & Tejada L. (2020). Characterization of proteolytic activity of artichoke (*Cynara scolymus* L.) flower extracts on bovine casein to obtain bioactive peptides. *Animals*, 10(5), 914.
- Bueno-Gavilá, E., Abellán, A., Girón-Rodríguez, F., Cayuela J.M., Salazar, E., Gómez, R., & Tejada, L. (2019). Bioactivity of hydrolysates obtained from bovine casein using artichoke (*Cynara scolymus* L.) proteases. *Journal of Dairy Science*, 102(12), 10711-10723.
- Bueno-Gavilá, E., Abellán, A., Girón-Rodríguez, F., Cayuela, J.M., & Tejada, L. (2021). Bioactivity of hydrolysates obtained from chicken egg ovalbumin using artichoke (*Cynara scolymus* L.) proteases. *Foods*, 10(2), 246.
- Campos, R., Guerra, R., Aguilar, M., Ventura, O., & Camacho, L. (1990). Chemical characterization of proteases extracted from wild thistle (*Cynara cardunculus*). *Food Chemistry*, 35(2), 89-97.
- Carbonell, M., Nuñez, M., & Fernández-García, E. (2002). Evolution of the volatile components of ewe raw milk La Serena cheese during ripening. Correlation with flavour characteristics. *Le Lait*, 82(6), 683-698.
- Cardinali, F., Taccari, M., Milanović, V., Osimani, A., Polverigiani, S., Garofalo, C., Foligni, R., Mozzon, M., Zitti, S., Raffaelli, N., Clementi, F., & Aquilanti, L. (2016). Yeast and mould dynamics in caciofiore della sibilla cheese coagulated with an aqueous extract of *Carlina acanthifolia* All. *Yeast*, 33(8), 403-414.
- Cardinali, F., Foligni, R., Ferrocino, I., Harasym, J., Orkusz, A., Franciosa, I., Milanović, V., Garofalo, C., Mannozi, C., Mozzon, M., Cocolin, L.,

- Osimani, A., & Aquilanti, L. (2022). Microbial diversity, morpho-textural characterization, and volatilome profile of the Portuguese thistle-curdled cheese Queijo da Beira Baixa PDO. *Food Research International*, 157, 111481.
- Cardinali, F., Osimani, A., Taccari, M., Milanović, V., Garofalo, C., Clementi, F., Polverigiani, S., Zitti, S., Raffaelli, N., Mozzon, M., Foligni, R., Franciosi, E., Tuohy, K., & Aquilanti, L. (2017). Impact of thistle rennet from *Carlina acanthifolia* All. subsp. *acanthifolia* on bacterial diversity and dynamics of a specialty Italian raw ewes' milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 255, 7-16.
- Carreira, A., Dillinger, K., Eliskases-Lechner, F., Loureiro, V., Ginzinger, W., & Rohm, H. (2002). Influence of selected factor on browning of Camembert cheese. *Journal of Dairy Research*, 69(2), 281-292.
- Castillo, M., Payne, F.A., Hicks, C.L., & Lopez, M.B. (2000). Predicting cutting and clotting time of coagulating goat's milk using diffuse reflectance: effect of pH, temperature and enzyme concentration. *International Dairy Journal*, 10(8), 551-562.
- Ceccarelli, N., Curadi, M., Picciarelli, P., Martelloni, L., Sbrana, C., & Giovannetti, M. (2010). Globe artichoke as a functional food. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 3(3), 197-201.
- Chavarri, F., Bustamante, M. A., Santisteban, A., Virto, M., Albisu, M., Barron, L. J. R., & de Renobales, M. (2000). Effect of milk pasteurization on lipolysis during ripening of ovine cheese manufactured at different times of the year. *Lait*, 80(4), 433-444.
- Chazarra, S., Sidrach, L., Lopez-Molina, D., & Rodríguez-López, J.N. (2007). Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus*, L.) flowers. *International Dairy Journal*, 17(12), 1393-1400.
- Chen, S., Zhao, J., & Agboola, S. (2003). Isolation and partial characterization of rennet-like proteases from Australian cardoon (*Cynara cardunculus* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(10), 3127-3134.
- Choi, J., Horne, D.S., & Lucey, J. A. (2007). Effect of insoluble calcium concentration on rennet coagulation properties of milk constituents. *Journal of Dairy Science*, 65, 2281-2290.

- Christen, C., & Virasoro, E. (1935). Présures végétales. Extraction et propriétés. *Le lait*, 15(144), 354-363.
- Claverie-Martín, F., & Vega-Hernández, M.C. (2007). Aspartic proteases used in cheese making. *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*, 207-219.
- Colombo, M.L., Cimino, C.V., Bruno, M.A., Hugo, A., Liggieri, C., Fernández, A., & Vairo-Cavalli, S. (2021). Artichoke cv. Francés flower extract as a rennet substitute: effect on textural, microstructural, microbiological, antioxidant properties, and sensory acceptance of miniature cheeses. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(4), 1382-1388.
- Colombo, M.L., Fernández, A., Cimino, C.V., Liggieri, C., Bruno, M., Faro, C., Verissimo, P.C., & Vairo-Cavalli, S. (2018). Miniature cheeses made with blends of chymosin and a vegetable rennet from flowers of *Silybum marianum*: Enzymatic characterization of the flower- coagulant peptidase. *Food Chemistry*, 266, 223–231.
- Cordeiro, M.C., Pais, M.S., & Brodelius, P.E. (1994). Tissue-specific expression of multiple forms of cyprosin (aspartic proteinase) in flowers of *Cynara cardunculus*. *Physiologia Plantarum*, 92(4), 645–653.
- Dalgleish, D. G. (1983). Coagulation of renneted bovine casein micelles: dependence on temperature, calcium ion concentration and ionic strength. *Journal of Dairy Research*, 50(3), 331-340.
- Dalgleish, D. G. (1980). Effect of milk concentration on the rennet coagulation time. *Journal of Dairy Research*, 47, 231-235.
- Dalgleish, D. G. & Law, A. J. R. (1988). pH-induced dissociation of bovine casein micelles. I: Analysis of liberated caseins. *Journal of Dairy Research*, 55, 529-538.
- de Farias, V.A., da Rocha Lima, A.D., Santos Costa, A., de Freitas, C.D.T., da Silva Araújo, I. M., dos Santos Garruti, D., Teixeira de Figueiredo, E.A. & de Oliveira, H.D. (2020). Noni (*Morinda citrifolia* L.) fruit as a new source of milk-clotting cysteine proteases. *Food Research International*, 127.
- Derso, A. G., & Dagnew, G. G. (2019). Isolate and Extract for Milk Clotting Enzymes from the leaves of *Moringa Oleifera*, *Carica Papaya* and *Mangifera Indica*

- and Use in Cheese Making: The Case of Western Hararage Region, Ethiopia. *Journal of Food and Nutrition Research*, 7(3), 244-254.
- Domingos, A., Xue, Z.T., Guruprasad, K., Clemente, A., Blundell, T., Pais, M.S., & Brodelius, P.E. (1998). An aspartic proteinase from flowers of *Centaurea calcitrapa*: Purification, characterization, molecular cloning, and modelling of its three-dimensional structure. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 436, 465-472.
- Engel, E., Nicklaus, S., Septier, C., Salles, C., Le Quéré, J. L. (2000). Taste active compounds in a goat cheese water-soluble extract. 2. Determination of the relative impact of water-soluble extract components on its taste using omission tests. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 4260-4267.
- Esteves, C.L. C., Lucey, J.A., Wang, T., & Pires, E.M.V. (2003b). Effect of pH on the gelation properties of skim milk gels made from plant coagulants and chymosin. *Journal of Dairy Science*, 86(8), 2558-2567.
- Esteves, C.L., Lucey, J.A., & Pires, E.M. (2002). Rheological properties of milk gels made with coagulants of plant origin and chymosin. *International Dairy Journal*, 12(5), 427-434.
- Esteves, C.L., Lucey, J.A., Hyslop, D.B., & Pires, E.M. (2003a). Effect of gelation temperature on the properties of skim milk gels made from plant coagulants and chymosin. *International Dairy Journal*, 13(11), 877-885.
- EUR-Lex. Council Regulation (EC) No. 510/2006 of 20 March (2006) on the Protection of Geographical Indications and Designations of Origin for agricultural products and foodstuffs.
- Eurostat (2023). Production of cheese. Bruselas: Eurostat. Recuperado a partir de: <https://ec.europa.eu/eurostat/databrowser/view/tag00040/default/table?lang=en>
- Feijoo-Siota, L., & Villa, T.G. (2011). Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications. *Food and Bioprocess Technology*, 4, 1066-1088.
- Fernández-Salguero, J., & Sanjuán, E. (1999). Influence of vegetable and animal rennet on proteolysis during ripening in ewes' milk cheese. *Food Chemistry*, 64(2), 177-183.

- Fernández-Salguero, J., Sánchez, E., Gomez, R., Mata, C., Vioque, M., & Tejada, L. (1999). A preliminary study of microbiological quality of *cardoons* *Cynara* L. used in the manufacture of traditional cheeses. *Milchwissenschaft*, 54(12), 688-690.
- Fernández-Salguero, J., Tejada, L., & Gomez, R. (2002). Use of powdered vegetable coagulant in the manufacture of ewe's milk cheeses. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(4), 464-468.
- Ferrandini, E., López, M.B., Castillo, M., & Laencina, J. (2011). Influence of an artisanal lamb rennet paste on proteolysis and textural properties of Murcia al Vino cheese. *Food chemistry*, 124(2), 583-588.
- Ferrazza, R.E., Fresno, J.M., Ribeiro, J.I., Tornadijo, M.E., & Furtado, M.M. (2004). Changes in the microbial flora of Zamorano cheese (PDO) by accelerated ripening process. *Food Research International*, 37(2), 149-155.
- Foligni, R., Mannozi, C., Gasparri, M., Raffaelli, N., Zamporlini, F., Tejada, L., Bande-De León, C., Orsini R., Manzi, P., Di Costanzo, M.G., Ritota, M., Anquilanti, L., & Mozzon, M. (2022). Potentialities of aqueous extract from cultivated *Onopordum tauricum* (Willd.) as milk clotting agent for cheesemaking. *Food Research International*, 158, 111592.
- Folkertsman, B. & Fox, P.F. (1992). Use of Cd-ninhydrin reagent to assess proteolysis in cheese during ripening. *Journal of Dairy Research*, 59(2), 217-224.
- Fox, P. F. (1989). Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *Journal of Dairy Science*, 72(6), 1379-1400.
- Frederiksen, P.D., Andersen, K.K., Hammershøj, M., Poulsen, H.D., Sørensen, J., Bakman, M., Qvist, K.B. & Larsen, L.B. (2011). Composition and effect of blending of noncoagulating, poorly coagulating, and well-coagulating bovine milk from individual Danish Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 94(10), 4787-4799
- Freitas, A. C., Macedo, A. C., & 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 Science and Technology International*, 6(5), 351-370.

- Galán, E., Cabezas, L., & Fernández-Salguero, J. (2012). Proteolysis, microbiology and sensory properties of ewes' milk cheese produced with plant coagulant from cardoon *Cynara cardunculus*, calf rennet or a mixture thereof. *International Dairy Journal*, 25(2), 92-96.
- 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 cheeses made with sheep milk. *International Dairy Journal*, 18(1), 93-98.
- 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 cheeses made with sheep milk. *International Dairy Journal*, 18(1), 93-98.
- García, V., Rovira, S., Boutoial, K., Ferrandini, E. & López, M.B. (2014) Effect of starters and ripening time on the physicochemical, nitrogen fraction and texture profile of goat's cheese coagulated with a vegetable coagulant (*Cynara cardunculus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(3), 552–559.
- Gomes, S., Belo, A.T., Alvarenga, N., Dias, J., Lage, P., Pinheiro, C., Pinto-Cruz, C., Brás, T., Duarte, M.F., & Martins, A.P.L. (2019). Characterization of *Cynara cardunculus* L. flower from Alentejo as a coagulant agent for cheesemaking. *International Dairy Journal*, 91, 178-184.
- Gómez, R., Sanchez, E., Vioque, M., Ferreira, J., Tejada, L., & Fernández-Salguero, J. (2001). Microbiological characteristics of ewes' milk cheese manufactured using aqueous extracts of flowers from various species of cardoon *Cynara* L. *Milchwissenschaft*, 56(1), 16-19.
- González de Llano, D., Polo, M.C. & Ramos, M. (1995). Study of proteolysis in artisanal cheeses: High performance liquid chromatography of peptides. *Journal of Dairy Science*, 78(5) 1018-1024.
- Grunert, K.G., Bredahl, L., & Brunsø, K. (2004). Consumer perception of meat quality and implications for product development in the meat sector—a review. *Meat science*, 66(2), 259-272.
- Guinee, T. P. & Wilkinson, M. G. (1992). Rennet coagulation and coagulants in cheese manufacture. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 45(4), 94-104.

- Hajji Nabih, M., El Hajam, M., Boulika, H., Hassan, M.M., Idrissi Kandri, N., Hedfi, A., Zerouale, A., & Boufahja, F. (2021). Physicochemical Characterization of Cardoon "*Cynara cardunculus*" Wastes (Leaves and Stems): A Comparative Study. *Sustainability*, 13(24), 13905.
- Harboe, M., Broe, M.L., & Qvist, K. B. The production, action and application of rennet and coagulants. En: *Technology of Cheesemaking*. Law B.A. y Tamime A.Y., editores. Chichester: Blackwell Publishing Ltd; 2010. p. 98-125.
- Heimgartner, U., Pietrzak, M., Geertsen, R., Brodelius, P., da Silva Figueiredo, A.C., & Pais, M.S.S. (1990). Purification and partial characterization of milk clotting proteases from flowers of *Cynara cardunculus*. *Phytochemistry*, 29(5), 1405-1410.
- Horne, D. S. (1998). Casein interactions: Casting light on the *black boxes*, the structure in dairy products. *International Dairy Journal*, 8(3), 171-177.
- IDF standard 110A; Determination of the clotting time of milk to which a milk clotting enzyme solution has been added. International Dairy Federation: Brussels, Belgium, 1987.
- International Dairy Federation (IDF 1958). Determination of dry matter in cheese and processed cheese. IDF Standard 4. Brussels: *International Dairy Federation*.
- International Dairy Federation (IDF 1987). Determination of the clotting time of milk to which milk-clotting enzyme solution has been added. IDF Standard 110A. Brussels: *International Dairy Federation*.
- International Organization for Standardization. (2001). Milk and milk products–Extraction methods for lipids and liposoluble compounds. Geneva, Switzerland: (ISO Standard No. 14156:2001). ISO: Geneva, Switzerland.
- International Organization for Standardization. (2014). Milk and milk products–Determination of nitrogen content–Part 1: Kjeldahl principle and crude protein calculation. Geneva, Switzerland: (UNE-ISO Standard No. 8968-1:2014). ISO: Geneva, Switzerland.
- ISO/IDF (International Standards Organization/International Dairy Federation). (2007). Milk - Determination of total milk-clotting activity of bovine rennets. (ISO 11815/IDF 157). IDF: Brussels, Belgium.

- Jacob, M., Jaros, D., & Rohm, H. (2010). The effect of coagulant type on yield and sensory properties of semihard cheese from laboratory-, pilot-and commercial-scale productions. *International journal of dairy technology*, 63(3), 370-380.
- Jacob, M., Jaros, D., & Rohm, H. (2011). Recent advances in milk clotting enzymes. *International journal of dairy technology*, 64(1), 14-33.
- Jakopović, K.L., Barukčić, I., & Božanić, R. Bioactive components derived from bovine milk. *Mljekarstvo*, 69(3), 151-161.
- Jeliński, T., Du, C. J., Sun, D. W., & Fornal, J. (2007). Inspection of the distribution and amount of ingredients in pasteurised cheese by computer vision. *Journal of Food Engineering*, 83(1), 3-9.
- Johnson, M. & Law, B. A. The origins, development and basic operations of cheesemaking technology. En: *Technology of Cheesemaking*. Law B.A. y Tamime A.Y., editores. Chichester: Blackwell Publishing Ltd; 2010. p. 62-96.
- Jones, B.N., Pablo, S. & Stein, S. (1981). Amino-acid Analysis and enzymatic sequence determination of peptides by an improved orthophthaldialdehyde pre-column labeling procedure. *Journal of Liquid Chromatography*, 4(4), 565-586.
- Khalidi, S., Sonnante, G., & El Gazzah, M. (2012). Analysis of molecular genetic diversity of cardoon (*Cynara cardunculus* L.) in Tunisia. *Comptes Rendus Biologies*, 335(6), 389-397.
- Kuchroo, C.N. & Fox, P.F. (1982). Soluble nitrogen in Cheddar cheese: comparison of extraction procedures. *Milchwissenschaft*, 37, 331-335.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259) 680-685.
- Lagaude, A., Fernandez, L., Cuq, J.L., & Marchesseau, S. (2004). Characterization of curd formation during the rennet coagulation of milk by an optical microscopic method. *International dairy journal*, 14(12), 1033-1039.
- Liburdi, K., Boselli, C., Giangolini, G., Amatiste, S., & Esti, M. (2019). An evaluation of the clotting properties of three plant rennets in the milks of different animal species. *Foods*, 8(12), 600.

- Liu, X., Wu, Y., Guan, R., Jia, G., Ma, Y., & Zhang, Y. (2021). Advances in research on calf rennet substitutes and their effects on cheese quality. *Food Research International*, 149, 110704.
- Llorente, B.E., Brutti, C. B., & Caffini, N.O. (2004). Purification and characterization of a milk-clotting aspartic proteinase from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(26), 8182-8189.
- Llorente, B.E., Obregón, W.D., Avilés, F.X., Caffini, N.O., & 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, 55-63.
- Lomholt, S. B., Worning, P., Øgendal, L., Qvist, K. B., Hyslop, D. B., & Bauer, R. (1998). Kinetics of the renneting reaction followed by measurement of turbidity as a function of wavelength. *Journal of Dairy Research*, 65(4), 545-554.
- Lufrano, D., Faro, R., Castanheira, P., Parisi, G., Veríssimo, P., Vairo-Cavalli, S., Simões, I., & Faro, C. (2012). Molecular cloning and characterization of procirsin, an active aspartic protease precursor from *Cirsium vulgare* (Asteraceae). *Phytochemistry*, 81, 7–18.
- Tu, M.L., Liu, H.X., Zhang, R.Y., Chen, H., Fan, F.J., Shi, P.J., Xu, X.B., Lu, W.H. & Du, M. (2018). Bioactive hydrolysates from casein: generation, identification, and in silico toxicity and allergenicity prediction of peptides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(9), 3416-3426.
- MAPA. 2022a. Caracterización del sector ovino y caprino de leche en España (Datos Año 2021). Accessed June 19, 2023. https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/caracterizacionovinoycaprinolechedatos2021_tcm30-562416.pdf
- MAPA. 2022b. Datos de las Denominaciones de Origen Protegidas (D.O.P.), Indicaciones Geográficas Protegidas (I.G.P.) y Especialidades Tradicionales Garantizadas (E.T.G.) de Productos Agroalimentarios. Año 2021. Accessed June 19, 2023. https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/calidad-diferenciada/informedop_igp_2021_tcm30-626301.pdf

- McCraig, T. N. (2002). Extending the use of visible/near-infrared reflectance spectrophotometers to measure colour of food and agricultural products. *Journal of Dairy Science*, 35(8), 731-736.
- Marcos, A., Esteban, M. A., Martinez, E., & Alcala, M. (1980). Thermal inactivation of proteinases from the flowers of the cardoon *Cynara humilis* L.: Kinetic and thermodynamic parameters [for milk clotting in cheese processing]. *Archivos de Zootecnia*, 29, 283-294.
- Martinez, E., & Esteban, M. A. (1980). Clotting activity of an extract from the flowers of the cardoon *Cynara humilis*. *Archivos de Zootecnia*, 29(114), 107-116.
- Martins, A. P. L., Vasconcelos, M. P., Sousa, R. B. (1996). Thistle (*Cynara cardunculus* L.) flower as a coagulant agent for cheesemaking: sort characterization. *Lait*, 76(5), 437-477.
- Mazorra-Manzano, M.A., Perea-Gutiérrez, T.C., Lugo-Sánchez, M.E., Ramirez-Suarez, J.C., Torres-Llanez, M.J., González-Córdova, A.F., & Vallejo-Cordoba, B. (2013). Comparison of the milk-clotting properties of three plant extracts. *Food chemistry*, 141(3), 1902-1907.
- McSweeney, P. L. H. & Sousa, M. J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheese during ripening: A review. *Le Lait*, 80(3), 293-324.
- Morishita, T., Deguchi, Y., Yajima, M., Sakurai, T., & Yura, T. (1981). Multiple nutritional requirements of lactobacilli: genetic lesions affecting amino acid biosynthetic pathways. *Journal of Bacteriology*, 148(1), 64-71.
- Mozzon, M., Foligni, R., Mannozi, C., Zamporlini, F., Raffaelli, N., & Aquilanti, L. (2020). Clotting properties of *Onopordum tauricum* (Willd.) aqueous extract in milk of different species. *Foods*, 9(6), 692.
- Mozzon, M., Foligni, R., Mannozi, C., Zamporlini, F., Raffaelli, N. & Aquilanti, L. (2020). Clotting properties of *Onopordum tauricum* (Willd.) aqueous extract in milk of different species. *Foods*, 9(6), 692.
- Muñoz, M., Fernández, D., Fresno, J.M., & Delgado, D. (2023). Effect of high hydrostatic pressure processing on the rennet coagulation kinetics and physicochemical properties of sheep milk rennet-induced gels. *Journal of Dairy Science*, 106(4), 2314-2325.

- Nájera, A.I., De Renobales, M., & Barron, L.J.R. (2003). Effects of pH, temperature, CaCl₂ and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk: a multifactorial study. *Food chemistry*, 80(3), 345-352.
- Napolitano, F., Braghieri, A., Piasentier, E., Favotto, S., Naspetti, S., & Zanolli, R. (2010). Cheese liking and consumer willingness to pay as affected by information about organic production. *Journal of dairy research*, 77(3), 280-286.
- Nassar, K.S., Lu, J., Pang, X.Y., Ragab, E.S., Yue, Y.C., Zhang, S.W. & Lv, J.P. (2020). Rheological and microstructural properties of rennet gel made from caprine milk treated by HP. *Journal of Food Engineering*, 267(109710).
- Nicosia, F.D., Puglisi, I., Pino, A., Caggia, C., & Randazzo, C.L. (2022). Plant milk-clotting enzymes for cheesemaking. *Foods*, 11(6), 871.
- OMA/AOAC (Official Methods of Analysis/Association of Official Analytical Collaboration). (2002). AOAC: Arlington, VA, USA.
- Ordiales, E., Benito, M.J., Martín, A., Fernández, M., Hernández, A., & de Guía Córdoba, M. (2013). Proteolytic effect of *Cynara cardunculus* rennet for use in the elaboration of 'Torta del Casar' cheese. *Journal of dairy research*, 80(4), 429-438.
- Ordiales, E., Martín, A., Benito, M.J., Fernández, M., Casquete, R. & de Guía Córdoba, M. (2014). Influence of the technological properties of vegetable rennet (*Cynara cardunculus*) on the physicochemical, sensory and rheological characteristics of 'Torta del Casar' cheese. *International journal of dairy technology*, 67(3), 402-409.
- Ordiales, E., Martín, A., Benito, M.J., Ruiz-Moyano, S., Gallardo, G., & Córdoba, M.D.G. (2016). Characterisation of the vegetable rennets used for 'Torta del Casar' cheesemaking by a protein profile method. *International Journal of Dairy Technology*, 69(2), 272-281.
- Petropoulos, S., Fernandes, Â., Pereira, C., Tzortzakis, N., Vaz, J., Soković, M., Barros, L., & Ferreira, I.C. (2019). Bioactivities, chemical composition and nutritional value of *Cynara cardunculus* L. seeds. *Food chemistry*, 289, 404-412.
- Petropoulos, S.A., Pereira, C., Tzortzakis, N., Barros, L., & Ferreira, I.C. (2018). Nutritional value and bioactive compounds characterization of plant parts

- from *Cynara cardunculus* L.(Asteraceae) cultivated in central Greece. *Frontiers in plant Science*, 9, 459.
- Phelan, M., Aherne-Bruce, S.A., O'Sullivan, D., FitzGerald, R.J., & O'Brien, N.M. (2009). Potential bioactive effects of casein hydrolysates on human cultured cells. *International Dairy Journal*, 19(5), 279-285.
- 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. *The FEBS journal*, 274(10), 2523-2539.
- Pino, A., Prados, F., Galán, E., McSweeney, P.L., & Fernández-Salguero, J. (2009). Proteolysis during the ripening of goats' milk cheese made with plant coagulant or calf rennet. *Food Research International*, 42(3), 324-330.
- Pires, E., Faro, C., Macedo, I., Esteves, C., Morgado, J., Veríssimo, P., Pereira, C. & Gomes, D. (1994). Flor do cardo versus quimosina no fabrico de queijos artesanais. *Boletim da Sociedade Portuguesa de Química*, 54, 66-68.
- Pulina, G., Milán, M.J., Lavín, M.P., Theodoridis, A., Morin, E., Capote, J., Thomas, D.L., Francesconi, A.H.D., & Caja, G. (2018). Invited review: Current production trends, farm structures, and economics of the dairy sheep and goat sectors. *Journal of dairy science*, 101(8), 6715-6729.
- Punia, H., Tokas, J., Malik, A., Sangwan, S., Baloda, S., Singh, N., Singh, S., Bhuker, A., Singh, P., Yashveer, S., Agarwal, S., & Mor, V. S. (2020). Identification and detection of bioactive peptides in milk and dairy products: remarks about agro-foods. *Molecules*, 25(15), 3328.
- Rako, A., Kalit, M.T., Rako, Z., Zamberlin, Š., & Kalit, S. (2022). Contribution of salt content to the ripening process of Croatian hard sheep milk cheese (Brač cheese). *LWT*, 162, 113506.
- Rampanti, G., Belleggia, L., Cardinali, F., Milanović, V., Osimani, A., Garofalo, C., Ferrocino, I., & Aquilanti, L. (2023). Microbial dynamics of a specialty italian raw ewe's milk cheese curdled with extracts from spontaneous and cultivated *Onopordum tauricum* Willd. *Microorganisms*, 11(1), 219.
- Reglamento (EU) No. 510/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 noviembre (2012), sobre los regímenes de calidad de los productos agrícolas y alimenticios. "Queso de Murcia al vino" (CE) No. ES-PDO-0105-01061-12.11.2012.

- Reis, P.J., & Malcata, F.X. (2011). Current state of Portuguese dairy products from ovine and caprine milks. *Small Ruminant Research*, 101(1-3), 122-133.
- Reis, P.M., Lourenço, P.L., Domingos, A., Clemente, A.F., Pais, M.S., & Malcata, F.X. (2000). Applicability of extracts from *Centaurea calcitrapa* in ripening of bovine cheese. *International dairy journal*, 10(11), 775-780.
- Reiter, B., Sorokin, Y., Pickering, A. & Hall, A.J. (1969). Hydrolysis of fat and protein in small cheeses made under aseptic conditions. *Journal of Dairy Research*, 36(1), 65-76.
- Roseiro, L.B., Barbosa, M., Ames, J.M., & 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), 76-85.
- Rouphael, Y., Cardarelli, M., Lucini, L., Rea, E., & Colla, G. (2012). Nutrient solution concentration affects growth, mineral composition, phenolic acids, and flavonoids in leaves of artichoke and cardoon. *HortScience*, 47(10), 1424-1429.
- Saldo, J., McSweeney, P.L.H., Sendra, E., Kelly, A.L., & Guamis, B. (2002). Proteolysis in caprine milk cheese treated by high pressure to accelerate cheese ripening. *International Dairy Journal*, 12(1), 35-44.
- Sánchez, E.S., Simal, S., Femenia, A., Lull, P., & Rosselló, C. (2001). Proteolysis of Mahon cheese as affected by acoustic-assisted brining. *European Food Research and Technology*, 212, 147-152.
- Sanjuán, E. & Fernández-Salguero, J. (1994). *Influencia de algunos factores sobre el tiempo de coagulación por cuajo vegetal (Cynara sp.)*. Alimentación, equipos y tecnología. 13(6), 69-73.
- 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.R.M., & Barros, M.T. (2009). Multiplicity of aspartic proteinases from *Cynara cardunculus* L. *Planta*, 230(2), 429-439.
- Schägger, H. (2006). Tricine–SDS–PAGE. *Nature Protocols*, 1(1), 16–22.
- Scintu, M.F., Del Caro, A., Urgeghe, P.P., Piga, C., & Di Salvo, R. (2010). Sensory profile development for an italian PDO ewe's milk cheese at two different ripening times. *Journal of Sensory Studies*, 25(4), 577-590.

- Scott, R. (2002). Fabricación de queso. Zaragoza: Ed. Acribia.
- Sentandreu, M.A. & Toldrá F. (2006). A fluorescence-based protocol for quantifying angiotensin-converting enzyme activity. *Nature Protocols*, 1(5), 2423-7.
- Serrano, E., & Marcos, A. (1980). Proteolytic activity of the extract from the flowers of *Cynara humilis* L.[cardoon]. *Archivos de Zootecnia*, 29, 11.
- Shah, M.A., Mir, S.A., & Paray, M.A. (2014). Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. *Dairy Science & Technology*, 94(1) 5-16.
- Shalabi, S.I. & Fox, P.F. (1987). Electrophoretic análisis of cheese: comparison of methods. *Journal of Food Science and Technology*, 11(2), 135-151.
- Sidrach, L., García-Cánovas, F., Tudela, J., & Rodríguez-López, J.N. (2005). Purification of cynarases from artichoke (*Cynara scolymus* L.): enzymatic properties of cynarase A. *Phytochemistry*, 66(1), 41-49.
- Silva, L.R., Jacinto, T.A., & Coutinho, P. (2022). Bioactive compounds from cardoon as health promoters in metabolic disorders. *Foods*, 11(3), 336.
- Silva, S.V., & Malcata, F.X. (2005). Studies pertaining to coagulant and proteolytic activities of plant proteases from *Cynara cardunculus*. *Food Chemistry*, 89(1), 19–26.
- Silva, S.V., & Malcata, F.X. (2004). Influence of the coagulant level on early proteolysis in ovine cheese-like systems made with sterilized milk and *Cynara cardunculus*. *Journal of food science*, 69(7), 579-584.
- Silva, S.V., Barros, R.M., & Malcata, F.X. (2002). Hydrolysis of caseins by extracts of *Cynara cardunculus* precipitated by ammonium sulfate. *Journal of Food Science*, 67(5), 1746-1751.
- Slamani, R., Labadi, R., Errahmani, M.B., & Bellal, M.M. (2018). Purification and characterisation of milk-clotting and caseinolytic activities of pepsin isolated from adult sheep abomasa. *International Journal of Dairy Technology*, 71(3), 764-770.
- Sousa, M. J., Ardö, Y., & McSweeney, P. L. H. (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 11(4-7), 327-345.

- Sousa, M. J., & Malcata, F. X. (1996). Effects of processing conditions on the caseinolytic activity of crude extracts of *Cynara cardunculus* L. *Food science and technology international*, 2(4), 255-263.
- Spanish Association for Standardization. 2018. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp. Part 1: Detection method. (UNE-EN ISO 11290-1:2017). UNE: Madrid.
- Spanish Association for Standardization. 2018. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the immunoenzymatic detection of staphylococcal enterotoxins in foodstuffs. (UNE-EN ISO 19020:2017). UNE: Madrid.
- Spanish Association for Standardization. 2021. Microbiology of the food chain- Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* - Part 1: Detection of *Salmonella* spp. – Amendment 1 Broader range of incubation temperatures, amendment to the status of Annex D, and correction of the composition of MSRV and SC. (UNE-EN ISO 6579-1:2017/A1:2021). UNE: Madrid.
- Steffl, A., Ghosh, B. C., & Kessler, H. -G. (1996). Rennetability of milk containing different heat-denatured whey protein. *Milchwissenschaft*, 51, 28-31.
- Tamer, I.M. (1993). Identification and partial purification of a novel milk clotting enzyme from *Onopordum turcicum*. *Biotechnology Letters*, 15(4), 427-432.
- Tamer, I.M., & Mutlu, M. (1994). A new approach to modelling enzyme kinetics by a novel enzyme from *Onopordum turcicum* and powdered calf rennet. *The Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal*, 56(1), B87-B90.
- Tavaria, F. K., Franco, I., Carballo, F. J., Malcata, F. X. (2003). Amino acid and soluble nitrogen evolution throughout ripening of Serra da Estrela cheese. *International Dairy Journal*, 13(7), 537-545.
- Tejada, L., & Fernandez-Salguero, J. (2003). Chemical and microbiological characteristics of ewe milk cheese (Los Pedroches) made with a powdered vegetable coagulant or calf rennet. *Italian journal of food science*, 15(1), 125-131.
- Tejada, L., Abellán, A., Cayuela, J.M., & Martínez-Cacha, A. (2006). Sensorial characteristics during ripening of the murcia al vino goat's milk cheese:

- The effect of the type of coagulant used and the size of the cheese. *Journal of sensory studies*, 21(3), 333-347.
- Tejada, L., Abellán, A., Cayuela, J.M., Martínez-Cacha, A., & Fernández-Salguero, J. (2008c). Proteolysis in goats' milk cheese made with calf rennet and plant coagulant. *International Dairy Journal*, 18(2), 139-146.
- Tejada, L., Abellan, A., Prados, F., & Cayuela, J. M. (2008b). Compositional characteristics of Murcia al Vino goat's cheese made with calf rennet and plant coagulant. *International journal of dairy technology*, 61(2), 119-125.
- Tejada, L., Buendía-Moreno, L., Hernández, I., Abellán, A., Cayuela, J.M., Salazar, E., & Bueno-Gavilá, E. (2022). Bioactivities of Mealworm (*Alphitobius diaperinus* L.) Larvae Hydrolysates Obtained from Artichoke (*Cynara scolymus* L.) Proteases. *Biology*, 11(5), 631.
- Tejada, L., Gomez, R., & Fernández-Salguero, J. (2007). Sensory characteristics of ewe milk cheese made with three types of coagulant: Calf rennet, powdered vegetable coagulant and crude aqueous extract from *Cynara cardunculus*. *Journal of Food Quality*, 30(1), 91-103.
- Tejada, L., Vioque, M., Gómez, R., & Fernández-Salguero, J. (2008a). Effect of lyophilisation, refrigerated storage and frozen storage on the coagulant activity and microbiological quality of *Cynara cardunculus* L. extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(8), 1301-1306.
- Twining, S.S. (1984). Fluorescein isothiocyanate-labeled casein assay for proteolytic enzymes. *Analytical Biochemistry*, 143 (1), 30-34.
- Veríssimo, 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 of Biochemistry*, 235(3), 762-768.
- Vianna, F.S., Canto, A.C.V.C.S., da Costa-Lima, B.R.C., Salim, A.P.A.A., Costa, M.P., Balthazar, C.F., Oliveira, B.R., Rachid, R.P., Franco, R.M., Conte-Junior, C.A. & Silva, A.C.O. (2017). Development of new probiotic yoghurt with a mixture of cow and sheep milk: effects on physicochemical, textural and sensory analysis. *Small Ruminant Research*, 149, 154-162.
- Vieira De Sá, F., & Barbosa, M. (1972). Cheese-making with a vegetable rennet from Cardo (*Cynara cardunculus*). *Journal of Dairy Research*, 39(3), 335-343.

- Vioque, M., Gómez, R., Sánchez, E., Mata, C., Tejada, L., & Fernández-Salguero, J. (2000). Chemical and microbiological characteristics of ewes' milk cheese manufactured with extracts from flowers of *Cynara cardunculus* and *Cynara humilis* as coagulants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(2), 451-456.
- Walstra, P., Geurts, T.J., Noomen, A., Jellema, A. & Van Boekel, M.A.J.S. (2001). *Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos*. Zaragoza: Ed. Acribia.
- Wedholm, A., Larsen, L. B., Lindmark-Mansson, H., Karlsson, A. H., & Andren, A. (2006). Effect of protein composition on the cheese-making properties of milk from individual cows. *Journal of Dairy Science*, 89(9), 3296-3305.
- White, P.C., Cordeiro, M.C., Arnold, D., Brodelius, P.E., & Kay, J. (1999). Processing, activity, and inhibition of recombinant cyprosin, an aspartic proteinase from cardoon (*Cynara cardunculus*). *Journal of Biological Chemistry*, 274(24), 16685-16693.
- Zenobi, S., Fiorentini, M., Aquilanti, L., Foligni, R., Mannozi, C., Mozzon, M., Zitti, S., Casavecchia, S., Al Mohandes Dridi, B., & Orsini, R. (2021). Effect of planting density in two thistle species used for vegetable rennet production in marginal Mediterranean areas. *Agronomy*, 11(1), 135.
- Zheng, X.C., Shi, X. W., & Wang, B. (2021). A review on the general cheese processing technology, flavor biochemical pathways and the influence of yeasts in cheese. *Frontiers in microbiology*, 12, 703284.
- Zikiou, A., & 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), 89-99.
- Zitti, S., Di Cecco, V., Casavecchia, S., Di Martino, L., & Aquilanti, L. (2020). Seed germination reports for *Onopordum tauricum* (Asteraceae). *Flora*, 30, 421-423.

