



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE VETERINARIA

Estudio del empleo de coagulantes vegetales en
la elaboración de quesos de cabra

D. Víctor García Alcaraz

2015



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

M^a BELÉN LÓPEZ MORALES, Profesora Titular de Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Murcia en el Dpto. de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología, AUTORIZA:

La presentación de la tesis doctoral titulada “Estudio del empleo de coagulantes vegetales en la elaboración de quesos de cabra” realizada por D. Víctor García Alcaraz, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia a 10 de junio de 2015

Quiero aprovechar este espacio para agradecer a todas las personas que han pasado por mi vida durante la larga marcha que es la realización de una Tesis Doctoral, y en especial a:

María Belén López, mi directora de Tesis, quien ha conseguido extraer gran parte de mi potencial a lo largo de estos años. Por su profesionalidad e inestimable ayuda sin la cual este estudio no hubiera podido salir adelante.

Al profesor Eduardo Ferrandini, con quien inicié el camino en la Universidad de Murcia y en el mundo de la investigación, que me ha llevado hasta donde estoy.

Al maestro queso Pere Argudo, con quien aprendí que con trabajo y empeño puedes conseguir lo que quieras (incluso un queso de calidad coagulado con flor de alcachofa).

A la empresa Alimer, por su colaboración y ayuda en esta investigación.

A los profesores José Laencina, M^a Dolores Garrido, M^a Belén Linares, Daniel Álvarez y Miguel Moliner por su apoyo a lo largo de todo este tiempo en el Departamento y por todo lo que he aprendido de cada uno de ellos.

A Silvia y a Khalid, que han sido mis compañeros en el mundo de los lácteos y juntos formamos un equipo imparable. A las “guays”: Miriam, Rocío y Macarena por todo lo que hemos compartido. A Fernando, por todas las horas trabajando juntos. A Mariella y Pedro, que aunque no estén en la Universidad siguen siendo parte de nosotros.

A los “becarios” que siguen en el Departamento y a los que ya no están por diversas razones: Adri, Paola, Jordi, Esther, Rafa, Alex, Sandra, Mario, Inés, Alberto, Yolanda y Naiara. Hemos pasado muy buenos momentos juntos. A “nuestros” técnicos, Antonio y Carmen, porque siempre han estado en el laboratorio para lo que necesitáramos.

A toda mi familia, y en especial a mis padres, Rosario y Victoriano, por su apoyo en todos los momentos de mi vida y a mis hermanas, Sonia y Cristina, por no dejar ni un segundo de hacerme sentir muy orgulloso de ellas.

A Bego, por todo el cariño, amor y fuerza que me ha transmitido desde que nos conocimos y que me ha ayudado tanto en el último tramo de este trabajo.

Finalmente, a los amigos y amigas de “la millor terreta del món” y a los que he tenido la suerte de hacer en mi paso por Murcia. Sin todos los momentos que he pasado con ellos, esto tampoco sería posible.

Víctor

Índice de Figuras y Tablas

Abreviaturas, Símbolos y Acrónimos

Resumen

Summary

I. Introducción.....	3
II. Objetivos.....	13
III. Antecedentes.....	17
III.1. Coagulantes vegetales.....	23
III.2. Control de la coagulación.....	30
III.3. Otros factores importantes en elaboración de queso.....	38
IV. Metodología.....	45
IV.1. Effect of vegetable coagulant, microbial coagulant and calf rennet on physicochemical, proteolysis, sensory and texture profiles of fresh goats cheese	45
IV.1.1. Leche.....	45
IV.1.2. Coagulantes.....	45
IV.1.3. Elaboración de queso fresco.....	46
IV.1.4. Análisis fisicoquímicos.....	48
IV.1.5. Fracciones nitrogenadas.....	48
IV.1.6. Urea-PAGE, SDS-PAGE y electroforesis capilar.....	49
IV.1.7. Análisis de textura.....	51
IV.1.8. Análisis sensorial.....	52
IV.1.9. Análisis estadístico.....	52
IV.2. Effect of starters and ripening time on the physicochemical, nitrogen fraction and texture profile of goat's cheese coagulated with a vegetable coagulant (<i>Cynara cardunculus</i>)	54
IV.2.1. Coagulante vegetal y cultivos iniciadores.....	54
IV.2.2. Elaboración de quesos y toma de muestras.....	55
IV.2.3. Análisis fisicoquímico de los quesos.....	56
IV.2.4. Fracciones nitrogenadas.....	57
IV.2.5. Análisis de textura.....	57
IV.2.6. Análisis estadístico.....	58
IV.3. A comparison of the use of thistle (<i>Cynara cardunculus</i> L.) and artichoke (<i>Cynara scolymus</i> L.) aqueous extracts for milk coagulation	59
IV.3.1. Determinación de la actividad coagulante.....	59
IV.3.2. Determinación del tiempo de coagulación.....	61
IV.3.3. Adaptabilidad tecnológica para la coagulación de la leche de cabra	62

IV.3.4. Análisis estadístico.....	62
IV.4. Physicochemical, microbiological, textural and sensory changes during the ripening of pasteurized goat milk cheese made with plant coagulant (<i>Cynara scolymus</i>)	63
IV.4.1. Leche, cultivo iniciador y coagulante vegetal.....	63
IV.4.2. Elaboración de queso y toma de muestras.....	63
IV.4.3. Análisis fisicoquímico.....	64
IV.4.4. Fracciones nitrogenadas.....	65
IV.4.5. Análisis microbiológico.....	65
IV.4.6. Análisis de textura.....	66
IV.4.7. Análisis sensorial.....	66
IV.4.8. Análisis estadístico.....	67
V. Resultados y discusión.....	71
V.1. Improvements in goat milk: A review.....	71
V.2. Effect of vegetable coagulant, microbial coagulant and calf rennet on physicochemical, proteolysis, sensory and texture profiles of fresh goats cheese	81
V.3. Effect of starters and ripening time on the physicochemical, nitrogen fraction and texture profile of goat's cheese coagulated with a vegetable coagulant (<i>Cynara cardunculus</i>)	101
V.4. A comparison of the use of thistle (<i>Cynara cardunculus</i> L.) and artichoke (<i>Cynara scolymus</i> L.) aqueous extracts for milk coagulation	111
V.5. Physicochemical, microbiological, textural and sensory changes during the ripening of pasteurized goat milk cheese made with plant coagulant (<i>Cynara scolymus</i>)	125
VI. Resumen global.....	137
VII. Conclusiones.....	153
VIII. Bibliografía.....	157

FIGURA 1	4
Número de cabezas de ganado caprino y producción de leche de cabra a nivel mundial.	
FIGURA 2	18
Dibujo esquemático de la hidrólisis (b) y el inicio de la agregación (c).	
FIGURA 3	28
Flor del cardo y planta de la alcachofa en floración.	
FIGURA 4	35
Perfil típico de retrodispersión de la luz obtenido por el CoAguLab™ con leche estándar y cuajo animal y parámetros derivados.	
FIGURA 5	58
Ejemplo de un perfil de textura típico en el análisis de queso. Los parámetros de textura estudiados fueron: dureza1 y dureza2 (N, picos F ₁ y F ₂ , respectivamente), cohesividad (adimensional, como A ₁ /A ₂), gomosidad (N, como dureza1×cohesividad), elasticidad (mm, distancia d ₂), masticabilidad (N·mm, como gomosidad×elasticidad) y adherencia (N·s, como A ₃).	
FIGURA 6	61
Perfil típico de retrodispersión de la luz obtenido mediante el CoAguLab™ con la leche estándar y cuajo bovino adulto, indicando los parámetros utilizados en el estudio.	
TABLA 1	5
Número de cabezas de ganado caprino y producción de leche y queso en Europa y España	
TABLA 2	24
Fuentes de coagulantes vegetales	
TABLA 3	53
Descripción de los atributos sensoriales	

° Be	grados Baumé
° C	grados Celsius
%	tanto por ciento
α	alpha
a.C.	antes de Cristo
β	beta
C ₁₀ y C ₁₂	ácidos grasos de 10 y 12 carbonos, respectivamente
Ca ²⁺	calcio libre
cm	centímetro
CL	CoAguLite™
CZE	electroforesis capilar
D_{max}	máximo valor de la primera derivada
DOP	denominación de origen protegida
EC	<i>Enzyme Commission</i>
FDM	grasa en fracción seca
g	gramos
HCl	ácido clorhídrico
IDF	Federación internacional de Lecheria
IMCU	unidades internacionales de actividad coagulante
ISO	Organización internacional de estándares
kDa	kiloDalton
kg	kilogramo
κ	Kappa
L	litro
LFV	prototipo sensor con un haz de largo campo de visión
μm	micrómetro
mM	milimoles
mg	miligramo
mm	milímetro

N	Newton
NIR	infrarrojo cercano
nm	nanómetro
NMFS	Humedad en fracción no grasa
Phe ₁₀₅ -Met ₁₀₆	enlace entre los aminoácidos fenilalanina y metionina de la κ -caseína
PDM	proteína en fracción seca
R _{LFV}	ratio del sensor LFV
R _{max}	ratio de reflectancia a tiempo T_{max} (adimensional)
Ser ₁₀₄ -Phe ₁₀₅	enlace entre los aminoácidos serina y fenilalanina de la κ -caseína
spp.	especies
SPS-PAGE	electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico-poliacrilamida
T	Tonelada
T _{cut}	tiempo desde la adición de la enzima hasta el corte visual (min).
T _{max}	tiempo desde la adición de enzima hasta el máximo de la primera derivada (min).
T _{2max}	tiempo desde la adición de la enzima hasta el máximo de la segunda derivada (min)
T _{2min}	tiempo desde la adición de la enzima hasta el mínimo de la segunda derivada (min)
TM	marca registrada
Urea-PAGE	electroforesis en gel de urea-poliacrilamida
v/v	volumen/volumen
w/w	peso/peso
w/v	peso/volumen
×g	unidad de rotación

RESUMEN

En esta Memoria de Tesis Doctoral, una vez analizadas las diferentes estrategias que actualmente se aplican para la mejora de la calidad de los productos derivados de la leche de cabra, se realizaron cuatro estudios para desarrollar un queso de cabra con coagulante vegetal. En el primero de ellos, se compararon cuatro tipos de queso fresco (elaborados con cuajo, coagulante microbiano y dos variedades de coagulante vegetal). Los resultados indicaron que los coagulantes vegetales presentaban un perfil de coagulación similar al cuajo y que la mayoría de parámetros fisicoquímicos de los quesos frescos no se vieron afectados por el tipo de coagulante. Los quesos elaborados con coagulante vegetal alcanzaron mayor dureza, gomosidad y masticabilidad. El análisis sensorial de los quesos determinó que los elaborados con coagulantes vegetales fueron más amargos y menos firmes. En base a los resultados alcanzados podemos concluir que, aunque los coagulantes vegetales se pueden usar como una alternativa al cuajo animal, nuevas estrategias tecnológicas deberían adoptarse para mejorar los resultados sensoriales, tales como aumento del tiempo de maduración y/o el uso de cultivos iniciadores.

En el segundo estudio se realizaron quesos de leche de cabra con coagulante vegetal (*Cynara cardunculus*) y diferentes cultivos iniciadores analizando la evolución de diferentes parámetros físico-químicos, microbiológicos y de textura durante la maduración. Los resultados indicaron que los diferentes cultivos iniciadores producían diferencias en los parámetros fisicoquímicos de pH, humedad, proteína, fracciones nitrogenadas y dureza de los quesos elaborados. La adición de fermentos mesófilos aseguró una correcta acidificación de los quesos y aumentó la dureza de los mismos, mientras que el uso de fermentos termófilos dio

lugar a la obtención de quesos más blandos y con una elevada proteólisis. La mezcla de cultivos mesófilos y termófilos disminuyó el grado de proteólisis en los quesos.

Se realizó un tercer estudio que comparó la actividad coagulante del extracto acuoso de la flor de alcachofa (*Cynara scolymus*) con el derivado de la flor del cardo (*Cynara cardunculus*). En primer lugar, se observó que el coagulante de alcachofa tenía una menor actividad coagulante que el obtenido del cardo. Sin embargo, si variamos las condiciones de coagulación (concentración del coagulante, temperatura y diferentes tiempos de almacenamiento en congelación) ambos coagulantes se comportan de forma similar en la coagulación de leche estándar. Además, durante la coagulación de leche de cabra, no se observaron diferencias en los parámetros ópticos derivados del sensor CoAguLabTM. Estos resultados sugieren que los extractos de la flor de alcachofa podrían utilizarse en la elaboración de queso de una forma similar a la utilización del extracto de cardo.

En el cuarto estudio se elaboraron quesos con un extracto vegetal de la flor de alcachofa (*Cynara scolymus*) y un cultivo iniciador comercial y se estudiaron los cambios que se producían a lo largo de la maduración. Los resultados mostraron que los parámetros fisicoquímicos evolucionaron de forma similar a los obtenidos por otros quesos durante la maduración, no siendo así para el perfil de textura y sensorial. Es importante, subrayar el hecho de que, a pesar de utilizar un coagulante vegetal, los quesos mostraron puntuaciones en el análisis sensorial para el sabor amargo, por lo que estos quesos podrían ser adecuados para la venta, siempre y cuando, se realizara un análisis de consumidores que confirmara estos resultados.

In this Doctoral Thesis Report, after a previous study about the different strategies which can be used to improve the goat's milk derived products, four studies were performed in order to develop goat cheese with vegetable coagulant. In the first study, four types of fresh cheese were compared (made with rennet, microbial coagulant and two varieties of plant coagulant). Results indicated that plants coagulants showed a coagulation similar to calf rennet and physicochemical parameters of fresh cheeses were unaffected by the type of coagulant used. However, texture parameters were affected, showing that cheeses made with vegetable coagulant had higher hardness, gumminess and chewiness. Furthermore, sensory analysis results determined that cheeses made with vegetable coagulants were bitter and less firm. The results of this study indicate that, although the plant coagulants can be used as an alternative to animal rennet, new technological strategies should be adopted to improve the sensory results, such as the increase of the maturation time and/or the use of starter cultures.

In the second study, various parameters of goat milk cheeses made with vegetable coagulant (*Cynara cardunculus*) and different starter cultures were controlled during the ripening. The results indicated that the different starter cultures produced significant differences in pH, moisture, protein, nitrogen fractions and hardness in cheeses. The addition of mesophilic starters ensured the proper acidification of the cheese and increased hardness, while the use of thermophilic starters produced soft cheeses and higher proteolysis. The mixture of mesophilic and thermophilic starters produced a shorter range of proteolysis.

A third study was carried out in order to check if aqueous extracts of artichoke flower (*Cynara scolymus*) could be used for cheese making, comparing it with

thistle aqueous extract (*Cynara cardunculus*). First, it was observed that artichoke extract had a lower coagulant activity than thistle coagulant. However, under different clotting conditions (coagulant concentration, different temperature and frozen storage time) both coagulants behave similarly in the coagulation of standard milk. Furthermore, during the clotting of goat milk, no differences in optical parameters derived from sensor CoAguLabTM were observed. These results suggest that artichoke flower extracts could be used in cheese manufacture in a similar way of thistle extract.

Finally, in the fourth study, using a plant extract of the artichoke (*Cynara scolymus*) and a commercial starter culture, cheeses were produced and the changes were checked along the ripening. The results showed that the physicochemical parameters evolved similarly to other cheeses, while the texture and sensory features evolved differently to what was found in the literature about other cheeses. It is important to underline that, despite using a vegetable coagulant, bitterness taste was scored very low in sensory analysis, so these cheeses could be suitable for sale, provided that an analysis with a representative consumer panel is carried out.

No basta saber, se debe también aplicar.
No es suficiente querer, se debe también hacer.

Johann Wolfgang von Goethe

I. INTRODUCCIÓN

Existen más de 2000 especies de animales que producen leche en todo el mundo. No obstante, diferentes factores (disponibilidad del animal, producción, características organolépticas o religión, entre otros) han favorecido que solamente unas especies se utilicen para la producción láctea de consumo humano, siendo la vaca la especie más utilizada para este fin. Sin embargo, otras especies animales son utilizadas para la obtención de leche en países con condiciones climáticas y geográficas particulares y/o en países con diferentes religiones (Faye y Konuspayeva, 2012). Según FAOSTAT (2015), del total de leche fresca producida en el mundo en el año 1961, sólo el 8.90% procedía de otros animales diferentes a la vaca, mientras que en el año 2013, de las 746.7 millones de toneladas de leche fresca, el 14.87% procedía de otras especies: búfala (10.72%), cabra (2.41%), oveja (1.35%) y camella (0.39%). Estas cifras ponen de relieve la importancia e interés creciente en la búsqueda y obtención de leche de otras especies diferentes a la tradicionalmente empleada (Faye y Konuspayeva, 2012).

En relación al ganado caprino, cabe señalar que la cabra fue el primer animal domesticado, en la antigua Mesopotamia, para la obtención de diversos productos (Boyazoglu *et al.*, 2005). En otras culturas antiguas, como la egipcia, la leche y el queso de cabra eran productos venerados por los faraones (Silanikove *et al.*, 2010) y en la antigua Roma, aunque la leche se utilizaba principalmente para consumo humano, en ocasiones se destinaba a la elaboración de queso, llegando este producto a ser moneda de cambio en algunas zonas del Imperio Romano (Freitas y Malcata, 2000). Estos hechos nos indican que, históricamente, la cuenca

mediterránea se ha caracterizado por ser una importante área agraria en la que las cabras tuvieron un papel muy importante dentro de la ganadería, probablemente por su adaptación al medio rústico y su capacidad de soportar inclemencias climáticas sin disminuir la calidad de sus alimentos derivados (Silanikove *et al.*, 2010).

En la actualidad, Asia concentra el mayor número de cabezas de caprino y la mayor producción de leche de cabra, seguida por África (Fig. 1). Sin embargo, aunque América se sitúa en tercer lugar en relación al número de cabezas de ganado, Europa ocupa el tercer lugar en la producción de leche de cabra (con un 16.19% del total de la producción mundial) debido a que la producción lechera en Europa se concentra en explotaciones intensivas mientras que en el resto de continentes la producción lechera todavía se realiza de manera tradicional.

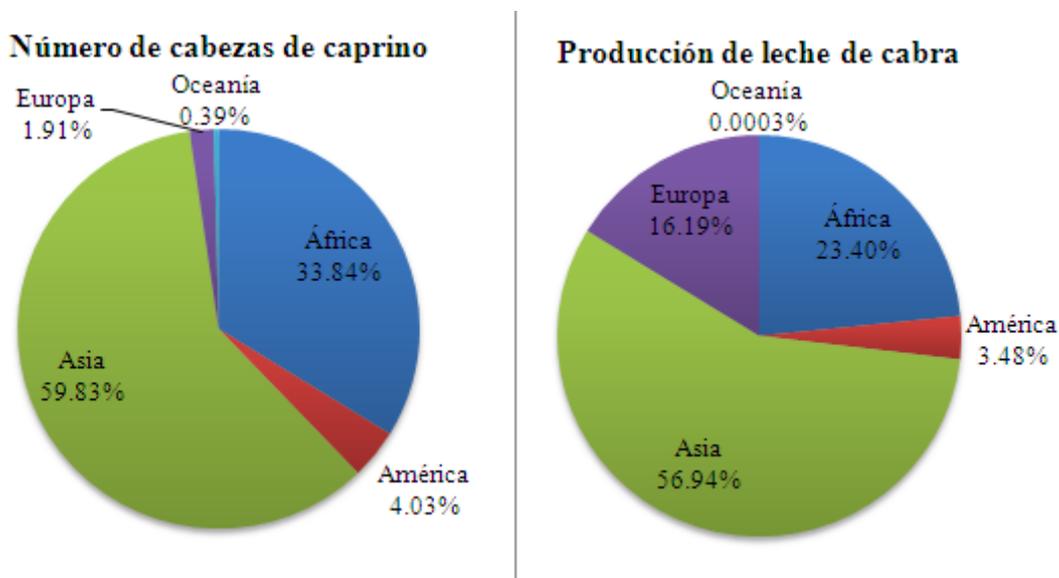


FIGURA 1. Número de cabezas de ganado caprino y producción de leche de cabra a nivel mundial.
Fuente: FAOSTAT (2015)

Como se puede observar en la Tabla 1, a pesar de que en los últimos 5 años el número de cabezas de ganado caprino ha ido disminuyendo en toda Europa, entre los años 2011 y 2013 se ha mantenido estable en 16.5 millones aproximadamente. En España, esta disminución parece seguir latente, aunque la disminución entre los años 2012 y 2013 es ligeramente inferior a la observada en años anteriores.

TABLA 1. Número de cabezas de ganado caprino y producción de leche y queso en Europa y España

Región	Producto	2009	2010	2011	2012	2013
Europa	Nº Cabezas	17,151,303	17,090,607	16,568,055	16,530,541	16,527,388
	Leche (T)	2,593,375	2,638,611	2,602,787	2,532,022	2,526,426
	Queso (T)	198,932	201,039	201,665	190,383	195,262
España	Nº Cabezas	2,933,782	2,903,779	2,692,898	2,637,340	2,609,990
	Leche (T)	515,000	522,113	467,000	443,625	471,999
	Queso (T)	42,168	42,765	38,094	35,280	37,800

Fuente: FAOSTAT (2015)

Además, según FAOSTAT (2015), tanto en España como en Europa, la producción de leche cabra creció durante los años 2000 y 2010, produciéndose un descenso entre 2010 y 2012, con un aumento en la producción en 2013, lo que podría indicar una posible mejoría del sector tras la crisis económica acontecida en el conjunto de los países de la Unión Europea. El aumento de la producción lechera junto el estancamiento del número de cabezas indica que se están mejorando las estructuras productivas fundamentalmente debido a las mejoras en la gestión agrícola y a la implantación de nuevas tecnologías de manejo y gestión.

Aunque las características nutricionales de la leche de cabra varían según la raza de la que proceda, de forma general, según Raynal-Ljutovac *et al.* (2008), la leche de cabra es una fuente de proteínas de alta calidad que posee una micela de caseína de mayor tamaño que la de la leche vaca o la de oveja y altamente

mineralizada. Además, presenta un elevado contenido de amino-ácidos, con una mayor concentración de seis aminoácidos esenciales (treonina, isoleucina, lisina, cisteína, tirosina y valina) en relación a la leche de vaca (Hanlein, 2004).

Sin embargo, la principal diferencia entre la leche de vaca y la de cabra radica en el perfil lipídico, y en particular en los ácidos grasos que contiene (Hanlein, 2004). Raynal-Ljutovac *et al.* (2008) indican que el contenido graso de la leche de cabra sufre variaciones cuantitativas y cualitativas según la época de lactación, la estación del año, el genotipo y la alimentación. La principal característica de la materia grasa de la leche de cabra es el elevado contenido en ácidos grasos de cadena corta y cadena media, que duplica al determinado en leche de vaca. Existen una serie de ácidos grasos que tienen interés desde el punto de vista terapéutico, como el cáprico (C₁₀) y el caprílico (C₁₂), que se han utilizado como tratamiento específico en diferentes enfermedades como el síndrome de mal-absorción, insuficiencia pancreática y déficit o ausencia de sales biliares (Sanz Sampelayo *et al.*, 2007). Además, la leche de cabra contiene una mayor cantidad de glóbulos grasos de pequeño tamaño en comparación a la leche de vaca, lo que aumenta su digestibilidad (Jandal, 1996). Este hecho permite que la leche de cabra también se pueda utilizar como suplemento de energía rápida en personas desnutridas o con síndrome de mal-absorción.

En relación al contenido de carbohidratos, la lactosa es el principal componente (44%), seguido por diferentes oligosacáridos de entre 3 y 10 monosacáridos, considerados como fibra soluble (Raynal-Ljutovac *et al.*, 2008).

Finalmente, en base al contenido en vitaminas y minerales, aunque existen menos estudios al respecto, la leche de cabra destaca por su alto contenido en vitaminas del grupo B y por una mayor presencia de potasio y cloro que otras leches. Además de las características nutricionales, diversos autores (Jandal, 1996; Guo, 1998) indican la baja alergenicidad de la leche de cabra en comparación con la leche de vaca. Por estas razones, la leche de cabra puede ser una alternativa para la elaboración de nuevos productos lácteos, ya que, además, proporciona una imagen de producto más natural y saludable (Raynal-Ljutovac *et al.*, 2008) que los productos lácteos obtenidos a partir de la leche de vaca.

Entre los diversos productos lácteos que se pueden elaborar a partir de la leche de cabra, el queso ocupa el papel principal en la mayoría de los países. Este alimento tiene más de 5000 años de antigüedad (Shah *et al.*, 2014) y se obtiene a partir de la coagulación total o parcial de la proteína de la leche, seguido de la eliminación parcial del suero, lo que genera una concentración de la mayoría de sus nutrientes (sobre todo de la proteínas) en el producto final. Existe una gran variedad de quesos de leche de cabra que se fabrican en todo el mundo, que se diferencian según la composición de la leche utilizada y la tecnología quesera aplicada (Park, 2001).

Como se puede observar en la Tabla 1, la producción de queso en España varía de forma directamente proporcional a la cantidad de leche producida, mientras que no se observa este comportamiento en el caso del queso producido en el total de Europa. Esto se debe a que, como indican Martínez *et al.* (2011), a pesar de que España es un importante productor de leche de cabra, el consumo de leche fluida o de derivados lácteos diferentes del queso (como yogur o leche coagulada) es

prácticamente despreciable, ya que un 98.2% de leche de cabra se utiliza para la elaboración de los diferentes quesos que se pueden encontrar a lo largo y ancho de la geografía española.

Martínez *et al.* (2011) realizan una recopilación de los diferentes quesos de cabra en España. Según estos autores existen un total de 32 quesos con diferencias sustanciales entre ellos en muchos aspectos, como el tipo de coagulación (ácida o enzimática), el tiempo (30-120 minutos) y temperatura de coagulación (25-35 °C), duración del período de maduración (días, semanas o incluso meses) y el lugar de maduración (cámaras o cuevas), el tipo de conservación posterior a la maduración (en aceite, en salmuera, ahumado) y la forma del queso (circulares, cúbico o cónico). Además, entre estos quesos de cabra, podemos diferenciar quesos con Indicación Geográfica Protegida (IGP) donde se encuentra, el queso de Los Beyos (Asturias/León) y quesos con Denominación de Origen Protegida (DOP): Camerano (La Rioja), Ibóres (Cáceres), Majorero (Fuerteventura), Palmero (La Palma), Queso de Murcia y Queso de Murcia al Vino (Región de Murcia).

Los diferentes quesos están elaborados con leches procedentes de distintas razas de cabras. Entre las diferentes razas de cabras para la obtención de la leche (Verata, Malagueña, Canaria,...) la raza Murciano-Granadinas es la raza autóctona española más conocida, y que se ha exportado a diferentes países de Europa, África y Sur-América (León *et al.*, 2012). Esta raza está considerada como una de las razas más productivas del mundo (Vacas, 2003) y su leche ofrece una excelente aptitud tecnológica para la elaboración quesera (López *et al.*, 1997) permitiendo la obtención de diferentes variedades de queso. La Región de Murcia, situada al sur-este de la península ibérica, es una de las áreas líder en producción

de leche y quesos de cabra, para la que se utiliza de forma mayoritaria su raza nativa, la cabra Murciano-Granadina, contando con el mayor número de explotaciones ganaderas, de cabezas y la mayor producción de leche.

La coagulación de la leche es uno de los procesos más importantes en la elaboración del queso y determina las propiedades finales del mismo debido a los cambios ocurridos en la degradación de la matriz proteica durante la coagulación. El tipo de enzima utilizado en la coagulación de la leche puede ser el responsable de diferencias en el sabor, el rendimiento quesero o el tiempo de procesamiento (Jacob *et al.*, 2011). El cuajo animal ha sido el producto más utilizado para la elaboración de queso, y contiene de forma mayoritaria la enzima quimosina, responsable de la coagulación de las caseínas (Shah *et al.*, 2014).

Entre las áreas de innovación en la elaboración de quesos, destaca el desarrollo de productos con nuevas características sensoriales y de textura. Entre las diversas formas de obtención de productos diferenciadores, la sustitución del cuajo animal por otros productos coagulantes puede permitir la obtención de productos distintos a los actualmente presentes en el mercado. Además, en los últimos años, ha habido un incremento de la producción de queso y una disminución de la fabricación de cuajo animal natural, por razones como la encefalopatía espongiiforme bovina (Roseiro *et al.*, 2003). Estos hechos ocasionan que solamente entre el 20-30% de la necesidad de coagulantes puedan ser cubierta por el cuajo animal (Jacob *et al.*, 2011) y que se esté produciendo una fuerte demanda de fuentes alternativas de coagulantes para la leche (Cavalcanti *et al.*, 2004). Entre estas alternativas encontramos la quimosina obtenida a partir de organismos modificados genéticamente o los coagulantes de origen microbiano, que se

obtienen a partir de procesos de fermentación a partir de bacterias o mohos (Jacob *et al.*, 2011). Sin embargo, los coagulantes obtenidos mediante organismos modificados genéticamente pueden ser rechazados por un sector de la población y/o no ser aceptados para la elaboración de quesos con DOP o quesos orgánicos según las leyes de algunos países de la Unión Europea (Jacob *et al.*, 2011).

Otra alternativa al cuajo animal, son los coagulantes de origen vegetal, que se obtienen mediante extractos acuosos a partir de flores deshidratadas de diferentes especies de plantas (Chazarra *et al.*, 2007) y que se han utilizado durante años en la elaboración de diferentes variedades de queso artesanal fundamentalmente en los países mediterráneos tanto de Europa como de África. Además, al ser una fuente natural de enzimas, los quesos obtenidos pueden ser consumidos por vegetarianos y ser certificados como comida Kosher y/o Halal (Pino *et al.*, 2009). Por lo tanto, este tipo de coagulante nos ofrece la posibilidad de utilizar nuevas enzimas con el fin de producirlas a nivel industrial y obtener así nuevos quesos para la creciente demanda mundial de quesos con una alta calidad (Hashim *et al.*, 2011)

II. OBJETIVOS

- 1- Comparar la influencia de diferentes coagulantes en los parámetros fisicoquímicos, sensoriales, proteolíticos y de textura de un queso fresco de cabra, para determinar su adaptabilidad tecnológica.
- 2- Evaluar las características fisicoquímicas, proteolíticas y de textura en quesos de leche de cabra pasteurizada elaborados con coagulante vegetal (*Cynara cardunculus* L.) y estudiar la influencia de diferentes cultivos iniciadores comerciales durante la maduración del queso de cabra.
- 3- Comparar el uso de extractos acuosos de cardo (*Cynara cardunculus* L.) y alcachofa (*Cynara scolymus* L.) para la coagulación de la leche. Dicho objetivo se alcanzará mediante la consecución de los siguientes objetivos secundarios:
 - a. Determinar la actividad coagulante de los extractos vegetales acuosos utilizando el método de Berridge y el sensor óptico CoAguLab™ en leche estándar.
 - b. Evaluar la influencia de diferentes parámetros (concentración de coagulante, temperatura y almacenamiento en congelación) sobre el tiempo de coagulación de leche estándar
 - c. Evaluar la adaptabilidad tecnológica del coagulante derivado de *Cynara scolymus* L. en la leche de cabra, comparándolo con el derivado de *Cynara cardunculus* por medio del sensor CoAguLab™.
- 4- Estudiar los cambios fisicoquímicos, texturales, microbiológicos y sensoriales que se producen durante la maduración de un queso de cabra elaborado con un coagulante de extracto acuoso de alcachofa y un cultivo iniciador comercial a nivel semi-industrial.

III. ANTECEDENTES

La coagulación de la leche es una de las etapas más importantes en la producción de quesos, y por lo tanto, uno de los procesos más estudiados en la fabricación quesera. La capacidad para coagular de la leche es debida fundamentalmente a las caseínas, proteínas que constituyen el 79% de las proteínas totales de la leche. Entre las diversas propiedades de las caseínas podemos destacar que no se desnaturalizan por las temperaturas utilizadas habitualmente en la industria quesera y que son proteínas sin una estructura específica, lo que les confiere una estructura espacial desordenada y la capacidad de adoptar diversos estados conformacionales. En la leche existen de forma mayoritaria cuatro tipos de caseínas: α_{s1} , α_{s2} , β y κ , en una proporción molar media de 3:0.8:3:1 respectivamente (Farrell *et al.*, 2006). De forma natural, las caseínas se encuentran formando parte de una estructura superior denominada micelas, que consisten en un complejo de caseínas unidas mediante fosfato de calcio. Estos complejos tienen una forma casi esférica y en su superficie se sitúan las κ -caseínas, que son la que confieren estabilidad a la estructura (Ferrandini *et al.*, 2006).

El proceso de coagulación está dividido en dos fases fundamentalmente: una fase primaria o enzimática y una segunda fase de formación del gel o fase de agregación, en la se produce un endurecimiento del gel (Castillo, 2001). Además, algunos autores incluyen una tercera fase: el proceso de expulsión del lactosuero o sinéresis junto a la reestructuración de la red proteica (Inda, 2000).

La primera fase se produce por la acción hidrolítica de proteasas (de origen animal, microbiano o vegetal) sobre el enlace Phe₁₀₅-Met₁₀₆ de la κ -caseína presente en la superficie de las micelas de caseína. Tras esta acción se producen

dos péptidos con propiedades bien diferenciadas, un glicomacropéptido formado por los residuos de aminoácidos 106 a 169 de la κ -caseína y otro fragmento formado por los residuos 1 a 105, denominado para- κ -caseína (Lucey, 2002). El glicomacropéptido es hidrofílico y soluble en agua por lo que pasa a formar parte del lactosuero mientras que la para- κ -caseína es altamente hidrofóbica y permanece enlazada a las micelas de caseína (Fig. 2).

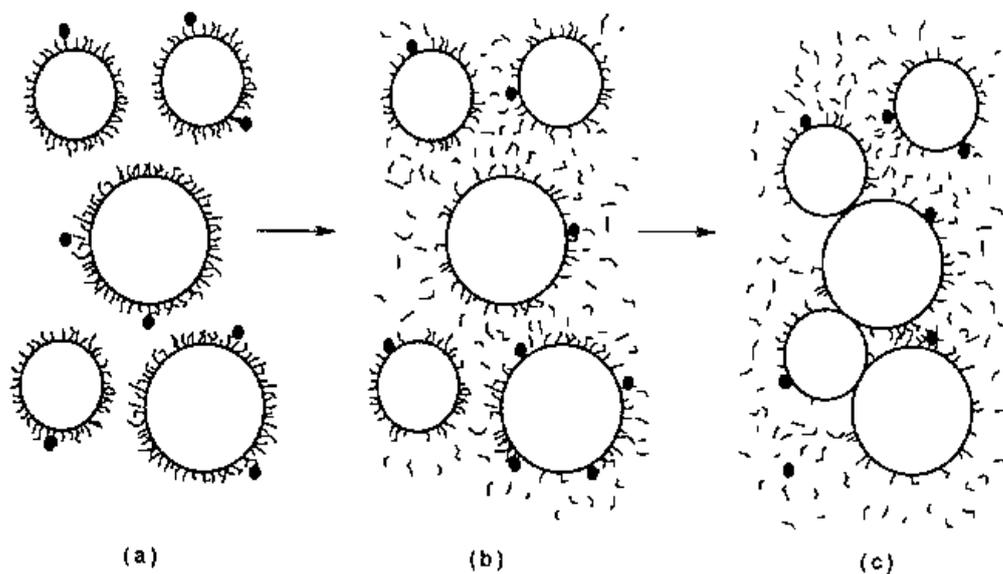


FIGURA 2. Dibujo esquemático de la hidrólisis (b) y el inicio de la agregación (c). Fuente: Castillo (2001).

La reacción acontecida sobre la κ -caseína produce una reducción del potencial eléctrico de las caseínas, que se traduce en una menor repulsión electrostática entre las mismas y que facilita por lo tanto la agregación de las micelas (Fig. 2c). Las micelas inestables forman una red tridimensional que se va endureciendo con el paso del tiempo y donde el calcio (Ca^{2+}) juega un papel importante como acelerador del proceso por su influencia sobre la agregación y un posible efecto en

la hidrólisis al disminuir el pH de la leche (Castillo *et al.*, 2002). No existe consenso sobre en qué momento se inicia la fase secundaria, o de agregación, ya que existen autores que consideran que el proceso se inicia al mismo tiempo que la hidrólisis mientras que otros indican que no puede empezar la agregación hasta que no se hayan hidrolizado más del 85% de las micelas de caseína (Castillo, 2000).

Una vez terminadas la fase de hidrólisis y agregación, el siguiente paso tras la coagulación es la sinéresis o eliminación de agua. En este proceso de deshidratación se produce una concentración de sólidos, donde la caseína y la fracción grasa se concentran de 8 a 10 veces según el contenido de agua final en el queso (Inda, 2000). La sinéresis es el principal método disponible para los fabricantes de queso para el control de la humedad final del queso, que se realiza mediante el trabajo de la cuajada en la cuba y contribuye a la diferenciación entre las variedades de quesos (Lucey, 2002). Por lo tanto, el control del proceso de sinéresis es muy importante ya que determina la humedad del queso, que a su vez determina las propiedades reológicas, químicas y organolépticas del queso (Castillo, 2001).

La coagulación está influenciada por diferentes factores, que debemos controlar para garantizar las propiedades del producto final. Dichos factores se pueden dividir principalmente en dos tipos: factores que definen la actitud de la leche para la coagulación (concentración y dimensiones de la caseína, relación calcio/nitrógeno, presencia de calostro o cualquier tratamientos previo a la leche que varía su capacidad coagulante) y los factores tecnológicos directos, que se pueden controlar más fácilmente, entre los que encontramos el pH de la leche, la

adición de cloruro cálcico, la temperatura de coagulación y la concentración y/o el tipo de enzima (Castillo, 2001).

El pH de la leche durante la coagulación oscila entre 6.3 y 6.6. Estos valores son menores (~5.6) cuando hay una acidificación directa y el proceso de coagulación es mixto (coagulación por acidificación y enzimática). Al disminuir el pH, la actividad hidrolítica es mayor, aumentando la velocidad del proceso de coagulación, aunque esta acidificación puede producir una disminución del rendimiento quesero.

La adición de Ca^{2+} (en forma de cloruro cálcico) es un factor importante en la coagulación de la leche, debido a que aumenta la firmeza de la cuajada, siempre y cuando la concentración no sea superior a 10 mM (Lucey y Fox, 1993). Además, una acidificación de la leche incrementa la actividad de los iones de calcio, lo que produce una disminución del tiempo de coagulación y un aumento de la firmeza mecánica de la cuajada (Lucey y Fox, 1993).

La temperatura de coagulación influye de forma inversamente proporcional sobre el tiempo de coagulación, ya que a mayor temperatura la leche coagula más rápidamente, y además, cambios en la temperatura influyen en la cantidad de κ -caseína hidrolizada durante la coagulación (Dalglish, 1983).

La concentración y el tipo de enzima utilizada para la coagulación de la leche es otro factor determinante, ya que a mayor concentración, el tiempo de coagulación disminuye y la elección de un tipo u otro de enzima, producirá cambios en las características del queso final. El uso de los diversos agentes utilizados en el proceso de coagulación influye en el rendimiento, textura del queso y/o el

desarrollo de sabores, debido a las diferencias producidas durante la degradación de la matriz proteica por la hidrólisis de las caseínas y la producción de péptidos hidrófobos (Queiroz Macedo *et al.*, 1996).

Los diferentes tipos de enzimas coagulantes se pueden agrupar en enzimas de origen animal, origen microbiano y origen vegetal. Las enzimas que se obtienen a partir del cuarto estómago de rumiantes jóvenes reciben el nombre de *cuajo*, mientras que el resto de enzimas procedentes de otro animal, o con origen vegetal o microbiano son catalogadas como *coagulantes* (BOE, 2013).

Como se ha comentado en la introducción de esta Memoria de Tesis Doctoral, el coagulante más utilizado para la elaboración de queso es el cuajo animal, que contiene dos enzimas responsables del proceso de coagulación: la quimosina, presente en más de un 80% del cuajo, y la enzima pepsina. La quimosina es muy específica y actúa hidrolizando el enlace Phe₁₀₅-Met₁₀₆ de la κ -caseína, mientras que la pepsina tiene una actividad más inespecífica e hidroliza además otros enlaces con los aminoácidos Phe, Tir, Leu o Val (Jacob *et al.*, 2011).

Los coagulantes microbianos han sido utilizados como sustitutos de cuajo animal ya que no hay ningún riesgo de transmisión de enfermedades de los rumiantes y su uso es aceptado por lacto-vegetarianos. Además, estos enzimas son fáciles de producir por fermentación, por lo que tienen una disponibilidad ilimitada (Jacob *et al.*, 2011). Este hecho nos permite obtener una enzima a un bajo precio, aunque el coste del coagulante utilizado en la elaboración representa sólo el 0.5% del precio final del queso (Ferrandini, 2006). Las enzimas microbianas más utilizadas son las proteasas derivadas de *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus* y/o

Cryphonectria parasitica, siendo las obtenidas a partir de *R. miehei* las más utilizadas como sustituto del cuajo animal durante casi 40 años (Jacob *et al.*, 2011). Las proteasas derivadas de *R. miehei* y *R. pusillus* hidrolizan el enlace Phe₁₀₅-Met₁₀₆, al igual que el cuajo animal. Sin embargo, *C. parasitica* actúan sobre el enlace Ser₁₀₄-Phe₁₀₅ en la κ -caseína y sobre la β -caseína.

Estos coagulantes microbianos muestran una serie de inconvenientes entre los que cabe destacar una alta actividad proteolítica durante la elaboración del queso, que da lugar a una pérdida de compuestos de degradación de las proteínas en el suero, y por lo tanto, una disminución del rendimiento quesero (Jacob *et al.*, 2011). Además, la mayor estabilidad térmica de los derivados obtenidos a partir de *R. miehei*, en comparación a otros coagulantes, está relacionado con una proteólisis excesiva, que puede dar lugar a la generación de sabores amargos en quesos con poco tiempo de maduración. Los coagulantes con una mayor estabilidad térmica que el cuajo de ternero deben ser evitados, o, al menos, la temperatura de coagulación debe ser modificada para limitar el alcance de la proteólisis (Sousa *et al.*, 2001). Según Jacob *et al.* (2011), la industria de las enzimas microbianas está reduciendo la termo-estabilidad de las enzimas, mediante modificaciones químicas tras la purificación de las mismas; intentando aumentar el ratio actividad coagulante/actividad proteolítica de las proteasas y buscando nuevos microorganismos que puedan ser capaces de producir enzimas con mejores características para la coagulación que los actualmente disponibles en el mercado.

III. 1. COAGULANTES VEGETALES

Un coagulante vegetal es cualquier producto vegetal que presente uno o varios componentes activos con capacidad coagulante y que, por lo tanto, pueda producir la desestabilización de las micelas de caseína y la formación del gel láctico o cuajada en la fabricación quesera. Los extractos vegetales se han utilizado desde tiempos antiguos como coagulantes para la elaboración de queso, ya que la primera referencia escrita data del año 50 a.C. y hace referencia a la coagulación con cardo, semillas de cártamo o los flujos de la higuera (Roseiro *et al.*, 2003). Las proteínas vegetales encargadas de la coagulación comparten un segmento extra de alrededor de 100 residuos, específico de las plantas. Este segmento tiene una secuencia de aminoácidos que las hace distintas a las proteínas aspárticas de origen animal o microbiano (Sarmiento *et al.*, 2009). Estas proteasas reciben nombres diferentes según su origen (ficinas, cardosinas, ciprosinas,...) y pueden proceder de semillas, frutos y/o raíces, aunque principalmente lo hacen de las flores. Los extractos de plantas, además de tener la capacidad de hidrolizar la κ -caseína, presentan una capacidad hidrolítica inespecífica que actúa sobre diversos enlaces de las α - y β - caseínas (Roseiro *et al.*, 2003).

El uso de vegetales como coagulantes para la elaboración de queso ha sido ampliamente estudiada y una gran variedad de especies vegetales han sido utilizadas para este fin (Tabla 2). A pesar de la gran a variedad de plantas con capacidad de coagular la leche, la mayoría tienen un ratio actividad coagulante/actividad proteolítica demasiado bajo, por lo que la excesiva actividad proteolítica reduce el rendimiento quesero y aumenta la percepción de los sabores

amargos, lo que hace muy difícil su uso para la producción de queso (Lo Piero *et al.*, 2002).

TABLA 2. Fuentes de coagulantes vegetales

Nombre científico	Nombre común
<i>Albizia julibrissin</i>	Árbol de la seda
<i>Ananas comosus</i>	Piña
<i>Calotropis procera</i>	Manzana de Sodoma
<i>Carica papaya</i>	Papaya
<i>Centaurea calcitrapa</i>	Abrojo
<i>Cirsium</i>	Cardo
<i>Cucurbita pepo</i>	Calabacín
<i>Cynara cardunculus</i> , <i>C. humilis</i> , <i>C. scolymus</i>	Cardo y alcachofa
<i>Ficus carica</i> , <i>F. glomerata</i> , <i>F. religiosa</i>	Higuera
<i>Lactuca sativa</i>	Lechuga
<i>Silybum marianum</i>	Cardo mariano
<i>Taraxacum officinale</i>	Diente de león

Fuente: Modificado de Roseiro *et al.* (2003).

Sin embargo, el extracto acuoso obtenido de las flores del cardo (*Cynara cardunculus*) se ha utilizado desde hace años en la producción de queso artesanal, ya que es efectivo en la coagulación de la leche y permite obtener quesos con alto valor debido a su sabor y calidad (Fernández-Salguero *et al.*, 2002). El uso de este tipo de coagulante es especialmente importante en los países del Mediterráneo, y específicamente en España y Portugal. En estos países, se elaboran actualmente diferentes quesos con coagulante vegetal (algunos acogidos a las DOP) sobre todo con leche de oveja, aunque también se elabora alguno con leche de cabra (Tejada

et al., 2008). Entre estos quesos, podemos destacar el Serra da Estrela o el Serpa en Portugal y la Torta del Casar en España.

El cardo (*C. cardunculus* L.) pertenece a la familia de *Asteareacea* y al género *Cynara*, que comprende un número pequeño de especies, entre las que podemos destacar *C. humilis* y *C. scolymus*, que también se consideran aptas para su utilización como coagulantes en la elaboración de queso. Las plantas de cardo silvestre, que crecen en el sur y oeste de las regiones del Mediterráneo, el sur de Portugal y en las Islas Canarias (Duarte *et al.*, 2006), son perennes y robustas, adaptadas a las condiciones climáticas del Mediterráneo. Presentan tallos altos y hojas espinosas, agrupadas en la base de la planta. Su ciclo reproductivo termina en verano y en este momento la parte superior de la planta se seca mientras que la raíz sigue viva, hasta que las condiciones climáticas son favorables e inicia un nuevo ciclo. La planta florece a partir del segundo ciclo de vida, y es a partir de este momento cuando podemos obtener los estigmas y estilos de las flores, que es donde se concentran la mayoría de las proteasas responsables de la coagulación de la leche (Ordiales, 2012).

C. cardunculus es el coagulante vegetal más utilizado y caracterizado (Tejada *et al.*, 2008; Ordiales *et al.*, 2014). Estudios recientes caracterizan la actividad coagulante y enzimática de los extractos crudos de plantas de la especie *Cynara*, junto a su capacidad para hidrolizar caseínas (Chazarra *et al.*, 2007). Las flores de *Cynara* spp. contienen grandes concentraciones de enzimas proteolíticas que son responsables de su actividad coagulante y que pueden ser extraídas con facilidad mediante una infusión acuosa.

Estas enzimas son proteinasas aspárticas que pertenecen a la familia de las endopeptidasas (EC 3.4.23), donde también se encuentran la pepsina y la quimosina, entre otras. Las proteinasas aspárticas se pueden encontrar en retrovirus, bacterias, hongos y parásitos de animales y están relacionadas con muchos procesos fisiológicos y/o patológicos (Sarmiento *et al.*, 2009). En las plantas, están involucradas en procesos altamente regulados como la creación de proteínas y/o la degradación de diferentes órganos de la planta (Simões y Faro, 2004).

En un primer momento, a las proteinasas encargadas de la coagulación se les dio el nombre de cynarasas, aunque en la actualidad se les suele nombrar como cardosinas o cyprosinas. Las primeras proteínas caracterizadas y purificadas fueron las cardosinas A y B y las cyprosinas 1, 2 y 3 (Heimgartner *et al.*, 1990; Cordeiro *et al.*, 1994). La presencia de dos tipos de proteinasas en la planta sugiere que en algún momento de la evolución, el gen que codifica estas enzimas se duplicó y dio lugar a dos ramas de creación de enzimas (Pimentel *et al.*, 2007). Tal multiplicidad de proteinasas aspárticas en los pistilos es una característica inusual, ya que en la mayoría de plantas estas enzimas están principalmente aisladas en semillas u hojas, y se encuentran a concentraciones mucho más bajas.

Las cardosinas A y B se encuentran en la parte femenina de la planta de *C. cardunculus* y están formadas por dos subunidades con diferentes pesos moleculares (31 y 15 kDa y 34 y 14 kDa, respectivamente). Veríssimo *et al.* (1995) describen que la cyprosina A es similar a la quimosina tanto en actividad como en especificidad, mientras que la cyprosina B es similar a la pepsina. Pimentel *et al.* (2007) describieron, además dos genes que no se habían

descubierto hasta la fecha y que serían los encargados de producir dos proteínas aspárticas más: las cardosinas C y D. Sarmiento *et al.*, (2009) identificaron y caracterizaron cuatro proteasas más de los pistilos de la flor del cardo: las cardosinas E, F, G y H. Además, los mismos autores sugieren al final de su estudio la posible existencia de otras proteínas aspárticas aún por identificar.

Por último, es importante señalar que una problemática asociada a los coagulantes vegetales derivados de las flores del cardo es la variabilidad de los extractos. Este hecho se debe principalmente a que esta planta se encuentra actualmente en tierras agrícolas marginales o abandonadas, donde se reproduce libremente, lo que puede originar variaciones genéticas sin control. Además, las flores utilizadas para obtener el coagulante vegetal provienen de diferentes plantas y localizaciones lo que pone de manifiesto una falta de trazabilidad que puede afectar a la calidad final del queso (Ordiales, 2012). Por otro lado, los coagulantes vegetales pueden ser el medio para la introducción de microorganismos patógenos y/o suciedad durante el procesado del mismo, por lo que para evitar estos problemas lo más adecuado sería la producción comercial de esta planta para su uso como coagulante vegetal (Ordiales, 2012).

Como se ha comentado con anterioridad, además del cardo, la alcachofa (*Cynara scolymus* L.) también puede utilizarse para la obtención de coagulantes vegetales mediante extracción acuosa, ya que muchas de las proteasas presentes en la flor de cardo también se encuentran en las flores de alcachofa (Roseiro *et al.*, 2003). *C. scolymus* L. es un cardo perenne, nativo del sur de Europa y norte de África que tiene unas características muy similares al cardo pero su flor no termina en espinas (Fig. 3)



FIGURA 3. Flor del cardo y planta de la alcachofa en floración.

FUENTE: Imágenes modificadas de La Gastronomía de José Soler (<http://www.gastrosoler.com>)

Sidrach *et al.* (2005) encontraron tres proteinasas (cynarasas A, B y C) presentes en los extractos acuosos de la flor de la alcachofa que al igual que los hallados en la flor de cardo eran capaces de hidrolizar los enlaces de κ -caseína y producir la desestabilización micelar necesaria para iniciar la coagulación de la leche. Los mismos autores señalaron que el pH óptimo de las proteinasas de la alcachofa es similar al determinado para las proteinasas de *C. cardunculus* L. Además, el grado de hidrólisis de las α -, β -, y κ -caseínas derivado de la utilización de un extracto de *C. scolymus* L. fue semejante al obtenido por el extracto acuoso de *C. cardunculus* L.

Por otro lado, Llorente *et al.* (2004) observaron que las proteasas de alcachofa se inactivan por el calentamiento moderado (más de 50% de las enzimas se

inactivaron en 10 min a 55 °C), y que, como consecuencia de la inactivación, la actividad proteolítica de la alcachofa se redujo durante la maduración del queso, disminuyendo así la probabilidad de formación de péptidos amargos en el queso. Sin embargo, es importante señalar que el amargor también se puede controlar mediante la optimización del nivel de retención de la enzima, mediante el empleo de cultivos iniciadores y controlando el pH del queso.

Estos hallazgos indican que los extractos acuosos vegetales derivados de las flores de la alcachofa muestran un gran potencial para su uso como coagulantes y podrían utilizarse en la fabricación de queso a nivel industrial, como demostraron Llorente *et al.* (2014), quienes en su trabajo concluyen que el extracto de flor de *C. scolymus* L., además de ser capaz de coagular la leche, era adecuado para la fabricación de queso tipo Gouda. Sin embargo, aunque se realizaron diversos estudios, tanto a nivel de laboratorio como de planta piloto, no existen estudios sobre la producción de quesos con el extracto de la planta de alcachofa a nivel industrial, por lo que sería necesario realizar estudios sobre los cambios físico-químicos, microbiológicos, texturales y/o sensoriales que se producen en el queso elaborado con dichas enzimas durante la maduración.

Al igual que el extracto coagulante de la flor de cardo, el uso de coagulante de alcachofa también puede presentar problemas por la introducción de microorganismos patógenos y suciedad de la recolección. A diferencia del cardo, la alcachofa sí que suele tener un mayor control de la trazabilidad, ya que la producción comercial de la planta está muy arraigada para el consumo directo de la alcachofa. Esto supone a la vez una ventaja y un inconveniente, puesto que para la obtención de los enzimas coagulantes, habría que dejar florecer la alcachofa y

por lo tanto, perder la posibilidad de la venta de un producto que se vende antes de la floración. En todo caso, para un mejor control de la calidad y salubridad de este coagulante, la solución pasaría por una producción específica de la flor de alcachofa para su uso como coagulante vegetal.

III. 2. CONTROL DE LA COAGULACIÓN

Para mejorar el control durante el proceso de coagulación, es esencial conocer la actividad coagulante de los enzimas que se van a utilizar. Con este objetivo se han propuesto varios métodos a lo largo del tiempo. Una de las primeras unidades utilizadas en la industria quesera fue la unidad Soxhlet (SU, por las siglas en inglés), que indica el volumen de leche coagulado por un volumen de cuajo durante 40 minutos a 35 °C. Esta unidad se expresa en forma de relación, por ejemplo 1:10,000 indicaría que 1 volumen de cuajo coagularía 10,000 volúmenes de leche. A pesar que este tipo de medida es muy fácil de entender para el usuario, la calidad, el pH o el tipo de leche pueden influir en la coagulación por lo que esta unidad debe utilizarse solo como una guía de aproximación de la fuerza coagulante.

Antiguamente, la British Standard Institution utilizaba las Unidades de Berridge o Unidades Renina (RU, por sus siglas en inglés). Esta unidad se define como la actividad en la que 10 mL de leche estandarizada es coagulada en 100 segundos a 30 °C (Law, 1999). El problema de este tipo de medida se encuentra en que la leche estándar contiene una cantidad de calcio mucho más elevada que la leche normal y que además, el pH de la leche estándar es de 6.3, cuando en la industria

quesera la leche suele oscilar entre valores de 6.5-6.7. Estos dos factores son muy importantes durante la coagulación láctea, por lo que el uso de estas unidades podría llevar a errores graves durante la elaboración de queso.

Con el fin de obtener una medida estándar, la Federación Internacional de Lechería (IDF por sus siglas en inglés), junto a la Organización Internacional para la Estandarización (ISO por sus siglas en inglés) y un grupo de expertos de la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC, por sus siglas en inglés) crearon en 1997 un método internacional para determinar la actividad coagulante del cuajo de origen bovino (IDF Standard 157A:1997). Este método, también conocido como Método de Berridge, fue revisado en el año 2007 (IDF, 2007) y expresa la fuerza coagulante en IMCU (International Milk Clotting Units) por gramo o por mililitro. A partir de este método estandarizado se han desarrollado otros para enzimas microbianas y otros coagulantes, como el cuajo de oveja o cabra. (Tabayehnejad *et al.* 2012). El tiempo de coagulación en el método de Berridge se determina mediante la observación de los primeros flóculos de cuajada que se forman en las paredes de tubos de ensayo en rotación y a partir de este tiempo, mediante el uso de un coagulante de referencia, se calcula la fuerza de coagulación del coagulante problema. Como se puede observar, este método depende mucho del observador o investigador, es decir, es un método subjetivo.

Con el fin de determinar el tiempo de coagulación de la leche y poder conocer el tiempo de corte adecuado para aumentar el rendimiento quesero se han utilizado varios métodos. Desde hace más de un siglo, para controlar el proceso de coagulación durante la elaboración quesera, los maestros queseros utilizan una técnica popularmente conocida como el test del cuchillo, que consiste en hacer un

corte en la cuajada con el cuchillo para ver si el corte es limpio y el exudado de suero es claro. Esto indica que la cuajada puede ser cortada y ayuda a conocer la firmeza del gel (Sbodio y Revelli, 2012). Este método fue ampliamente extendido, pero sigue siendo un método subjetivo, por lo que a partir de los años 30 comenzaron a utilizarse técnicas que intentaban monitorizar en continuo las propiedades de los geles de manera objetiva y con el objetivo de controlar la coagulación de la leche. Surgieron diversos métodos basados en diferentes propiedades como la viscosidad, la conductividad eléctrica o el color o métodos basados en los cambios de la cuajada durante la coagulación, como la floculación, cambios microscópicos en la leche o el efecto de la presión en la cuajada (Sbodio y Revelli, 2012). Algunos de estos métodos tienen el gran inconveniente de que interrumpen el proceso de coagulación y no son adecuados para aplicaciones en línea (Castillo *et al.*, 2000).

Aunque no se ha conseguido un sistema completamente eficaz y adecuado para el seguimiento de la coagulación y la determinación del tiempo de corte, según Sbodio y Revelli (2012) los instrumentos con mayor desarrollo e implementación comercial a partir de los años 90 están basados en técnicas térmicas, técnicas de ultrasonidos o técnicas de dispersión de radiación infrarroja cercana (NIR, por sus siglas en inglés).

La espectroscopia por infrarrojo cercano se basa en la radiación electromagnética de longitudes de onda en el rango 780-2500 nm y se utiliza para el análisis sensorial y/o para conocer la composición fisicoquímica de la materia prima y del producto final (Osborne, 1986). La radiación penetra en la capa superficial de las partículas, lo que produce una excitación en las moléculas y una dispersión de la

radiación en todas direcciones, que produce a su vez, un espectro de reflectancia (Castillo, 2001).

Entre los sistemas basados en la espectroscopia por infrarrojo cercano cabe destacar el trabajo realizado por Payne y Hicks (1992), quienes desarrollaron y patentaron un sensor óptico con fibra óptica basado en esta tecnología para el control de la coagulación durante la elaboración de queso. Algunos de los ensayos realizados con este sensor fueron publicados por Payne *et al.* (1993b), quienes utilizaron una longitud de onda de 940 nm para monitorizar la coagulación de leche de vaca y paralelamente calcular el tiempo de corte formográfico, encontrando una alta correlación entre ambos, siempre y cuando se tuviera en cuenta el porcentaje de proteínas de la leche. Además, Payne *et al.* (1993a), a una longitud de onda de 820 nm observaron una correlación directa entre la cantidad de grasa de la leche (1-5%) y la respuesta del sensor.

Payne *et al.* (1996) estudia el ruido del sensor y su efecto en la precisión del equipo encontrando una desviación estándar de tan solo 10 segundos en la determinación del punto de inflexión de la curva de reflectancia frente al tiempo (T_{max}). Con el parámetro objetivo T_{max} se desarrolló un algoritmo que relacionaba éste con el tiempo de corte (T_{cut}): $T_{cut} = \beta * T_{max}$, donde β es una constante que permite ajustar la predicción a la selección subjetiva del tiempo de corte realizada visualmente por el quesero (Castillo, 2001) y poder ajustar así el algoritmo a cada tipo de leche y a cada tipo de queso.

El desarrollo de este algoritmo mejoró la automatización del proceso y permitió la fabricación de dos sensores de fibra óptica que monitorizan la coagulación de la

leche e indican el tiempo de corte de la cuajada: CoAguLabTM (para análisis a nivel de laboratorio) y CoAguLiteTM (diseñado para su acoplamiento a cubas industriales o experimentales).

El sensor CoAguLabTM es un sistema óptico de control de la cinética de las enzimas durante la coagulación de la leche, equipado con dos cubetas de medición con capacidad para 100 mL de leche cada una, rodeadas de una cámara de agua aislada para el control de la temperatura y de manera opcional se pueden añadir otras sondas para el control del pH. Este sensor tiene un emisor de luz infrarroja a 880 nm que llega a la leche a través de una fibra óptica. La retrodispersión de la luz generada en la leche se transmite de nuevo a través de fibra óptica y toda la información recogida por los sensores se envía a un ordenador, donde un software específico muestra los datos en tiempo real. A partir del perfil de retrodispersión calcula diversos parámetros o índices de coagulación entre los que destacan el T_{max} y el tiempo de corte (T_{cut}), proporcionando además otros parámetros ópticos (Fig. 4).

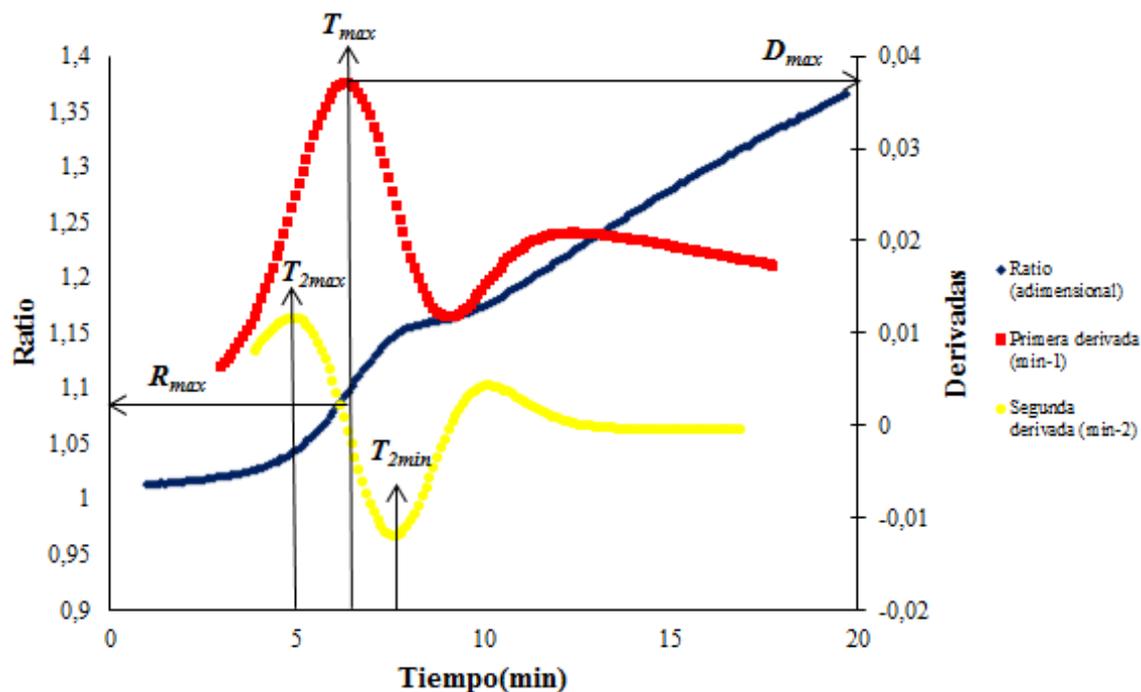


FIGURA 4. Perfil típico de retrodispersión de la luz obtenido por el CoAguLab™ con leche estándar y cuajo animal y parámetros derivados.

Los parámetros que se muestran en la Fig. 4 se definen, según Castillo (2001), como:

- T_{max} : tiempo desde la adición de la enzima hasta el máximo de la primera derivada (min).
- D_{max} : máximo valor que alcanza la primera derivada (min^{-1}).
- R_{max} : ratio de reflectancia a tiempo T_{max} (adimensional).
- T_{2max} : tiempo desde la adición de la enzima hasta el máximo de la segunda derivada (min)
- T_{2min} : tiempo desde la adición de la enzima hasta el mínimo de la segunda derivada (min).

Mediante su utilización en laboratorio y realizando de forma paralela el método de Berridge, Tabayehnejad *et al.* (2012) concluyeron que el sensor CoAguLab™

podría representar una alternativa al método de Berridge y determinar de forma objetiva la actividad coagulante de diferentes enzimas coagulantes disponibles comercialmente mediante la utilización de los parámetros ópticos T_{max} y T_{2min} .

El sensor CoAguLite™ está basado en el mismo principio que el sensor CoAguLab™ pero fue diseñado para su incorporación en la cuba quesera y poder controlar así el proceso de coagulación en línea durante la elaboración de queso. La emisión de luz es a 880 nm y tanto la emisión como la retrodispersión generada se transmiten a través de fibra óptica (600 μm). Al igual que el CoAguLab™, este sensor permite la obtención de diversos parámetros ópticos (Fig. 4) y del tiempo óptimo de corte de la cuajada teniendo en cuenta posibles cambios de temperatura, pH o contenido de calcio añadido en la leche, lo que permite optimizar y estandarizar la producción quesera.

Los estudios llevados a cabo por Castillo *et al.* (2006) se realizaron para comprobar el efecto de la temperatura y la concentración de la enzima y verificaron el uso de este sensor (CoAguLite™) para el control en línea del proceso de coagulación. Sin embargo, estos sensores están diseñados para el control de la coagulación y no son capaces de controlar el proceso de sinéresis, que es otra etapa relevante en la optimización de los procesos de producción y ejerce un papel muy importante en la calidad del queso final (Dejmek y Walstra, 2004).

Fagan *et al.* (2007a y b) observaron que la separación del suero y de la cuajada en dos fases produjo una dispersión de los datos derivados del sensor CoAguLite™ y que además esta dispersión aumentó durante el proceso de sinéresis. Estos hechos

dificultan la monitorización de los datos y la obtención de algoritmos de predicción. Con el fin de solventar estos problemas, Fagan *et al.* (2007a) desarrollaron un nuevo sensor de retro-reflexión de la luz con un amplio campo de visión (LFV). Este sensor permitió controlar la coagulación y la sinéresis sin una alta dispersión de los valores obtenidos, ofreciendo así la posibilidad de predecir el rendimiento, la humedad de la cuajada y la pérdida de grasa en el suero (Fagan *et al.*, 2007a y b; Fagan *et al.*, 2008).

Sin embargo, las etapas consideradas en el estudio de este prototipo no se ajustan a las empleadas en la industria quesera. Por ejemplo, el uso de agitación constante tras el corte de la cuajada en el estudio no tiene en cuenta las diferentes etapas de reposo, calentamiento o desuerado que podrían realizarse durante la elaboración de diferentes tipos de queso. Como los propios autores comentan, era necesario validar el uso de este sensor a nivel de planta piloto con prácticas estándar de quesería para su posterior implementación a nivel industrial.

Este trabajo fue realizado por Rovira *et al.* (2012a) quienes aplicaron el sensor LFV para la elaboración de queso fresco de cabra a nivel de planta piloto. Estos autores observaron que las mejores longitudes de onda fueron a 990, 1000 y 1010 nm, ya que mostraban la menor dispersión de los datos y unos modelos de predicción con menores desviaciones y mejores coeficientes de regresión que los determinados a otras longitudes de onda. A partir de los resultados obtenidos en este estudio, Rovira *et al.* (2012b) aplicaron este sensor en la elaboración industrial de Queso de Murcia al Vino. Estos autores confirmaron la utilidad del sensor para predecir la humedad de la cuajada con un error del 5% y así estandarizar la humedad de la cuajada antes del proceso de maduración. Además,

se desarrollaron un total de 27 modelos de predicción para el cálculo de la humedad, el rendimiento y de parámetros de textura como la dureza, la elasticidad y la adhesividad.

III. 3. OTROS FACTORES IMPORTANTES EN LA ELABORACIÓN DE QUESOS

Además del control sobre la coagulación y la sinéresis, en la elaboración de quesos existen otros factores a tener en cuenta que pueden influir de forma determinante en la calidad del producto final. De todos estos factores se han seleccionado los que tienen interés para el desarrollo de esta Memoria de Tesis Doctoral: la pasterización de la leche, el uso de fermentos que influyen en la maduración de los quesos y la proteólisis.

Actualmente, en los países industrializados todavía se elaboran quesos con leche cruda por las características sensoriales y de texturas que aportan la microflora natural de la leche, que varía de una región a otra en función de las condiciones geográficas y climáticas. Sin embargo, a pesar que la leche posee una serie de sistemas antimicrobianos y que tanto los equipos de recogida y manipulación como el personal están más preparados para reducir posibles contaminaciones cruzadas, el uso de leche cruda está, a veces, relacionado con la aparición de características desagradables en el queso, debido a la alta presencia de microorganismos en la materia prima (Pereira *et al.*, 2008). En Europa, especialmente en Italia, Francia y Suiza, todavía se producen diversos quesos con leche cruda. Sin embargo, cada vez más, los fabricantes tienden a realizar algunos

tratamientos sobre la leche para mejorar la calidad microbiológica de los productos derivados y cumplir las normas vigentes de comercio internacional.

Uno de los tratamientos previos de higienización más utilizado para reducir la carga microbiana patógena es la pasteurización. Este proceso se realiza casi de forma universal en intercambiadores de calor de placas y consiste en un tratamiento térmico de, como mínimo, 72 °C durante 15 segundos, aunque la temperatura utilizada en el proceso se puede aumentar para asegurar la inocuidad del producto (Varnam y Sutherland, 1994). A pesar que el tratamiento está pensado para eliminar la microflora patógena, durante el proceso también se destruyen una serie de microorganismos (bacterias, mohos y levaduras) que podrían ser útiles en la maduración del queso.

Para reemplazar la compleja microflora eliminada y poder elaborar quesos con propiedades sensoriales similares a quesos elaborados con leche cruda pero más seguros, se utilizan cultivos iniciadores o *starters* comerciales de forma individual o combinada con cultivos de maduración. Los cultivos iniciadores son “preparaciones microbianas de un elevado número de células con al menos un microorganismo que se añaden para producir la fermentación controlada de un alimento” (Leroy y De Vuyst, 2004). Las propiedades que se esperan de un cultivo iniciador dependen mucho del producto que se quiera obtener, pero de forma general pueden reducirse a dos: acidificación rápida y producción de sabores y olores agradables (Hassan y Frank, 2001).

Se pueden clasificar de muchas formas distintas, pero una de las más utilizadas es por su temperatura óptima de crecimiento. Así, encontramos *starters* mesófilos,

termófilos y psicrófilos. Estos últimos no se suelen utilizar porque su temperatura óptima de crecimiento es muy baja para la elaboración quesera (-5 °C y 5 °C). Sin embargo, los cultivos mesófilos (~30 °C) y los termófilos (40-45 °C) sí que se utilizan dependiendo de las condiciones de elaboración y del tipo de queso a elaborar.

Actualmente, en la industria quesera se utilizan de forma mayoritaria los cultivos iniciadores que contienen bacterias lácticas. Éstas producen ácido láctico a partir de la lactosa, lo que se traduce en una acidificación de la cuajada, un sabor fresco y ácido en quesos sin madurar y cambios en la textura de la cuajada. Dentro de este grupo de bacterias podemos destacar los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus* (Varnam y Sutherland, 1994). Además, el uso de cultivos iniciadores junto a cultivos de maduración también puede ayudar a reducir el nivel de descriptores negativos, como el sabor amargo, como demostraron Gaborit *et al.* (2001) utilizando una mezcla de levaduras y *Geotrichum* spp.

El uso de cultivos de maduración o de afinado se utiliza sobre todo para la elaboración de quesos de pasta blanda tipo Camembert, ya que las levaduras producen un aumento del pH por la metabolización del ácido láctico que produce un aumento de la actividad de mohos y dan lugar a la textura cremosa característica de estos tipos de quesos. Entre los microorganismos que están relacionados con este tipo de maduración y que podemos encontrar en cultivos comerciales, se encuentran diferentes especies de *Micrococcus* y levaduras (Varnam y Sutherland, 1994). En la formación de la corteza de los quesos pueden influir microorganismos diferentes, aunque los más importantes son *Penicillium*

camemberti o *Brevibacterium linens*. Para controlar el crecimiento de estos microorganismos es muy importante controlar la temperatura y la humedad relativa de las cámaras de maduración. De manera que el uso de cultivos iniciadores comerciales y/o cultivos de afinado en la elaboración de quesos de leche pasteurizada disminuye la probabilidad de que en el futuro se desarrollen microorganismos indeseables en el queso y asegura de este modo la producción de quesos homogéneos (Mendia *et al.*, 2000), de calidad, seguros y diferentes a los presentes en el mercado.

Los sabores y olores de los quesos de leche de cabra son importantes porque son atributos sensoriales que juegan un papel importante en la aceptación del consumidor. Estos atributos sensoriales pueden cambiar a lo largo de la maduración debido al efecto de la proteólisis, la cual está influenciada por diferentes factores, aunque principalmente por el tipo de coagulante utilizado o los diferentes microorganismos presentes en el queso (Ortigosa *et al.*, 1999).

En la maduración de los quesos, la hidrólisis inicial de la caseína puede estar inducida por el coagulante residual presente en el queso o por las proteinasas presentes en la leche y este proceso tiene un papel muy importante en la textura del queso, debido a cambios en la estructura tridimensional de las proteínas. Roa *et al.* (1999) en el queso de La Serena observaron que la proteólisis inicial se debía principalmente a la acción residual del coagulante vegetal. Además, Delgado *et al.* (2010) observaron en el queso La Torta del Casar que la alta actividad proteolítica de las enzimas presentes en el coagulante vegetal permite la obtención de quesos con una textura blanda y cremosa que no se puede obtener con otros coagulantes.

La proteólisis inicial produce la formación de péptidos de tamaño medio, los cuales pueden ser utilizados como sustrato por las enzimas de los microorganismos presentes en el queso (Sousa *et al.*, 2001) para dar lugar a la formación de péptidos más pequeños y finalmente, aminoácidos libres (proteólisis secundaria). El empleo de coagulantes vegetales produce un alto nivel de la proteólisis en las primeras etapas de la maduración (Galan *et al.*, 2008), de modo que un mayor número de péptidos estarán disponibles en la proteólisis secundaria y por lo tanto, pueden ejercer un papel determinante en la concentración de aminoácidos libres en el queso, que a su vez, contribuyen significativamente en el aroma y sabor del queso.

Podemos concluir que los cultivos iniciadores y las enzimas coagulantes son los principales responsables de la proteólisis del queso durante la maduración y desempeñan un papel determinante en el perfil sensorial y de textura del queso, debido principalmente a la presencia de proteasas y peptidasas (Bergamini *et al.*, 2006). Por lo tanto, el estudio de la evolución de los atributos sensoriales de los quesos durante la maduración es de gran interés, especialmente para el desarrollo de nuevos productos lácteos que difieran de los actualmente disponibles en el mercado.

IV. METODOLOGÍA

IV.1. Effect of vegetable coagulant, microbial coagulant and calf rennet on physicochemical, proteolysis, sensory and texture profiles of fresh goats cheese

IV.1.1. Leche

Cincuenta litros de leche de cabra de raza Murciano-Granadina procedente de la granja de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia se recogieron el día anterior a la elaboración de queso fresco. La leche se pasteurizó inmediatamente después de la recepción a 78 °C durante 30 s mediante el empleo de un intercambiador de calor de placas (100 L Alfa Laval, Lund, Suecia). Posteriormente se enfrió a 4°C y se almacenó hasta su posterior utilización en la elaboración del queso. El contenido medio de grasa, de proteína y de materia seca de la leche fue $5.38 \pm 0.01\%$, $3.72 \pm 0.06\%$ y $9.16 \pm 0.02\%$, respectivamente.

IV.1.2. Coagulantes

Las muestras deshidratadas de *Cynara cardunculus* de la variedad silvestre (*C. cardunculus* subsp. *flavescens*) y de la variedad cultivada (*C. cardunculus* subsp. *cardunculus*) seleccionada en la Escuela de Ingenieros Agrónomos (ETSIA) de Madrid, fueron proporcionadas por el Instituto de Tecnología Agroalimentaria (INTAEX) de Badajoz. La extracción acuosa de los coagulantes vegetales en ambas especies (silvestre y cultivada) se realizó mediante la suspensión de 10 g de flores, previamente trituradas, en 90 mL de agua durante 30 min. El extracto resultante se filtró a través de un paño de quesería y se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min. (Kubota 2010, Tokio, Japón). El sobrenadante se filtró con un

pañó de quesería y se mantuvo a 4 °C hasta su utilización (nunca superior a 2 días).

El coagulante microbiano (50 L NG RENIPLUS, Caglio Star España SA, Murcia) utilizado fue una enzima termolábil obtenido por la fermentación de *M. miehei*, con una actividad coagulante de 750 IMCU mL⁻¹ (International Milk Clotting Units). La composición enzimática y la actividad coagulante del cuajo de ternera líquido fueron proporcionadas por Caglio Star S.A. (Cieza, Murcia, España). La muestra contenía 80% quimosina y una actividad coagulante de 180 IMCU mL⁻¹.

IV.1.3. Elaboración de queso fresco

La elaboración de los quesos se realizó en la Planta Piloto de Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Murcia a partir de leche pasteurizada de cabra Murciano-Granadina y en un cuba doble cero (Tipo 10 L, Pierre Guerin Technologies, Mauzé, Francia). Esta cuba tiene acoplados dos sensores: el sensor CoAguLite™ (CL) (modelo 5, Reflectronics Inc., Lexington, KY) que cuantifica la retrodispersión de la luz a una longitud de onda de 880nm (Payne *et al.*, 1993a), y el sensor Large-Field of View (LFV) (prototipo de la Universidad de Kentucky, Lexington, KY) cuya absorción de la luz se determina a 990 nm. Ambos sensores disponen de dos fibras ópticas, una que transmite la luz a la longitud de onda deseada hasta la muestra de leche, y otra que conduce la reflectancia difusa producida por las partículas de la muestra hasta un fotodetector. La respuesta de la retro-dispersión de la luz se monitorizó de forma continua por los dos sensores desde el momento de la adición de cuajo hasta el final de la sinéresis, considerando éste como el tiempo en el que se inicia el vaciado de la cuba. Los

detalles de la configuración del sensor y su ubicación en la cuba de cuajado fueron descritos por Rovira *et al.* (2012a). El ratio de la luz de retrodispersión para el sensor LFV (R_{LFV}) se obtuvo tal como describen Fagan *et al.* (2008).

Diez litros de leche de cabra pasteurizada se calentaron durante 10 min hasta alcanzar una temperatura constante de 33°C. Una vez alcanzado este valor de temperatura y mientras se agitaba la leche lentamente, se añadieron 4 mL de CaCl_2 (Chr. Hansen, Francia) a una concentración de 510 gL^{-1} . Posteriormente, se añadieron los diferentes coagulantes a la leche (cuajo líquido de origen animal (A), *C. cardunculus* subsp. *cardunculus* (V_1), *C. cardunculus* subsp. *flavescens* (V_2) y coagulante microbiano (M)). La concentración de los enzimas coagulantes aplicada se estandarizó, con el fin de que todas las enzimas presentaran la misma actividad coagulante (56 IMCU L^{-1} de la leche), utilizando como referencia el extracto de cuajo con un 80% de quimosina sobre un sustrato de leche estándar (Milk powder for rennet testing/25 kg. Batch: S1-3 02-552. Chr. Hansen, Denmark) mediante el método de Berridge (IDF 1997). El tiempo de corte (T_{cut}) se determinó multiplicando T_{max} por $\beta = 2.5$, tal como describen Fagan *et al.* (2007a), donde T_{max} es un parámetro óptico derivado del CL, que indica el tiempo desde la adición de la enzima hasta el máximo de la primera derivada. Después de cortar la cuajada (20 s), ésta se agitó durante 5 min, seguidos de un período de reposo de 5 min. Este proceso se repitió dos veces, para finalizar con una agitación final de 5 min. La cuajada se depositó en moldes circulares (95 × 60 mm, de diámetro interno y altura, respectivamente), donde previamente se había colocado un paño de quesería, y se prensó en una prensa horizontal (Metal work S.p.a., Concesio, Italia) a 1 atm durante 10 min. Posteriormente se introdujo en

salmuera (17 °Be) durante 20 min. Este procedimiento de fabricación del queso se repitió tres veces en días alternos. Cuatro quesos de 300-400 g se obtuvieron de cada cuba, que se congelaron a la salida de la salmuera a -18 °C en la cámara de congelación de la planta piloto en la Universidad de Murcia hasta su posterior análisis, excepto las muestras utilizadas para el análisis sensorial y textura.

IV.1.4. Análisis fisicoquímicos

El contenido de grasa del queso se determinó por duplicado mediante el método de Gerber (ISO 3433: 1975). El contenido de humedad se cuantificó a partir de una muestra de 3 ± 0.1 g en una estufa de secado (Binder FED 115, Tuttlingen, Alemania) a 105 °C hasta peso constante, según el estándar IDF 4A (1982). El contenido de proteína del queso se calculó según el método de Kjeldhal (IDF 1964). La destilación se lleva a cabo en un destilador automático Büchi (323, Flawil, Suiza). La medición se completó usando un titulador automático 20-Metrohm (SM Titrino 702, Suiza). El contenido de humedad en la fracción no-grasa (NMFS) se calculó mediante la fórmula: $\%NMFS = M \times 100 / 100 \times F$, donde F es el porcentaje de grasa del queso y M es el porcentaje de humedad del queso. El color en el queso se analizó mediante un colorímetro Minolta (R-200/08 Chroma Meter II, Minolta Ltd, Milton Keynes, Reino Unido), y los resultados se expresaron como valores CIELab (a^* , b^* y luminosidad (L^*)).

IV.1.5. Fracciones nitrogenadas

El contenido de las fracciones nitrogenadas de los quesos se determinó siguiendo el método descrito por Ardö (1999). Se utilizó una solución de citrato $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$

para el análisis de nitrógeno total (NT) y nitrógeno soluble (SN) a pH 4.4. El nitrógeno no proteico (NPN) soluble en ácido tricloroacético al 12% (TCA) se analizó a partir de la fracción de SN a pH 4.4. Cada análisis se realizó por triplicado.

IV.1.6. Urea-PAGE, SDS-PAGE y electroforesis capilar

Aislamiento de las caseínas

Las caseínas se obtuvieron mediante el método adaptado de Pirisi *et al.* (2007). Las muestras de queso (5 g) se dispersaron en 25 mL de un tampón de citrato de sodio $0.4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ a pH 8 a temperatura ambiente y se homogeneizaron durante 30 s con un Stomacher (IUL Instruments, Barcelona, España). Las caseínas se obtuvieron por precipitación de las suspensiones de queso mediante la adición de HCl $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ hasta alcanzar un pH de 4.6, seguido por centrifugación a $3000 \times g$ durante 10 min. El sobrenadante se descartó, mientras que el precipitado se lavó tres veces con agua a pH 4.6 ajustada con HCl $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ y se liofilizó hasta su posterior análisis.

Electroforesis en Urea-PAGE

La fracción insoluble a pH 4.6 se disolvió en una solución de urea $9 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ que contenía 2-mercaptoetanol ($10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) y se analizó en Mini-Protean III (BioRad, Hercules, CA) mediante electroforesis en gel de urea-poliacrilamida (urea-PAGE) a pH 8.6, de acuerdo con el procedimiento descrito por Chianese *et al.* (1992), con una concentración de acrilamida del 12%. Las proteínas se tiñeron con azul de Coomassie G-250.

Electroforesis en SDS-PAGE

La electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico-poliacrilamida (SDS-PAGE) se realizó siguiendo la técnica de Laemmli (1970), con un 15% en gel de poliacrilamida (4% gel de apilamiento, 0,75 mm de espesor) y utilizando una unidad de electroforesis Mini-Protean Cell III (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Las caseínas se desnaturalizaron a 100 °C durante 5 min en Tris-HCl, pH 6.8, que contiene un 1% de SDS (w/v) y un 4% de 2-mercaptoetanol. Inmediatamente después de ser cargados, se transmitió una corriente 200 V sobre los geles hasta que las bandas principales migraron aproximadamente 1 cm desde la parte inferior del gel. Los geles se retiraron inmediatamente de las placas y se colocaron en una solución fijadora de metanol al 40% (v/v) y 10% de TCA (w/v) durante 12 h.

Las proteínas se tiñeron con Azul de Coomassie G-250 y después se destiñeron en una solución que contiene 40% de metanol (v/v) y 10% de ácido acético (v/v). La degradación de la caseína se estudió por densitometría informatizada de la imagen escaneada (Zeineh 1D, American Biotecnología Aplicada, San Diego, CA).

Electroforesis capilar

Tanto las muestras como los tampones de electroforesis se prepararon según Feligini *et al.* (2005). Las muestras de caseína liofilizada para electroforesis capilar (CZE) se prepararon según Clément *et al.* (2006) disolviendo en la muestra tampón (1:100, w/w). La suspensión se incubó durante 1 h a temperatura ambiente y se agitó de forma periódica. Antes del análisis de CZE, los tampones y las muestras se filtraron a través de filtros de 0,22 µm (Millex-GV, Millipore Corporation, Bedford, MA). La CZE se llevó a cabo usando un sistema Beckman

P/ACE MDQ (Beckman Coulter, Inc. Fullerton, CA) con una columna capilar no recubierta de sílice fundida (capilar Tubing, 338472, Beckman Coulter, Inc. Fullerton, CA), con 570 mm de longitud total por 50 μm de diámetro interno y 375 μm de diámetro externo. La distancia entre la ventana de detección y la salida fue de 70 mm, lo que resulta en una longitud del capilar efectiva de 500 mm. Las migraciones se realizaron a 30 °C con un voltaje constante de 20 kV y una intensidad de 70 μA . Las soluciones muestra se inyectaron a 0,5 psi (1 psi = 6894.76 Pa) durante 15 s, y la detección se realizó a 214 nm. Los niveles de α_{s1} -, β_1 -, β_2 -, p- κ - y pre- α_s -caseína se determinaron por triplicado y se expresaron como pico de área corregido (valor obtenido dividiendo el área integrada del pico por el tiempo de migración).

IV.1.7. Análisis de textura

El análisis de perfil de textura (TPA) se realizó mediante el uso de un texturómetro QTS-25 (Brookfield CNS Farnell, Borehamwood, Hertfordshire, Inglaterra) equipado con una célula de carga de 25 kg y la versión 2.1 del software *Texture Pro*. Para este análisis, se cortaron cuatro muestras en forma de cubo (3×3×3 cm) a partir de un queso sin corteza, se envolvió en papel de aluminio y se atemperó a 20±0.5 °C durante 3 h antes de la realización del ensayo. Los cubos se colocaron en el centro de la placa de medida con la ayuda de una regla. Las condiciones de la prueba fueron: 20 °C de temperatura ambiente, dos ciclos consecutivos de compresión del 50% a una velocidad constante de bajada de 30 $\text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$ y un punto de inicio de 0.05 N. Las variables de textura, dureza (expresada en N), gomosidad (expresado en N), masticabilidad (expresado en N ·

mm), cohesividad (adimensional) y elasticidad (expresado en mm), se calcularon según Bourne (1978).

IV.1.8. Análisis sensorial

Los atributos sensoriales se determinaron un día después de la fabricación del queso por 25 panelistas entrenados específicamente para este producto. En la Tabla 3, se describe la ficha de análisis sensorial con una escala no estructurada de 10 puntos. Cada queso se dividió en dos partes, que fueron etiquetados utilizando diferentes dígitos escogidos al azar. Una mitad se dividió en trozos de aproximadamente 1 cm de espesor mientras que la otra mitad se utilizó para la fase visual. Se utilizaron, manzanas verdes, panecillos duros sin sal y agua mineral para eliminar cualquier regusto entre muestras.

IV.1.9. Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los datos se realizó con el programa SPSS v15.0 (2006, SPSS Ibérica SLU 165 Madrid, España).

TABLA 3. Descripción de los atributos sensoriales

Atributo	Descripción	Puntuaciones		
		1	5	10
Apariencia				
Blancura	Sensación visual que abarca del blanco al negro	gris oscuro	amarillo suave	blanco
Textura				
Rugosidad	Superficie granulosa detectada con el dedo	manzana “Granny Smith”	cara inferior de una galleta	mantecado
Humedad	Presencia de agua en la superficie del queso detectado con el dedo	casaca de nuez	interior de la piel de naranja	corte una manzana “Granny Smith”
Elasticidad	Deformabilidad del queso detectado con el dedo	zanahoria	aceituna verde rellena	salchicha de cóctel
Firmeza	Fuerza requerida para romper el queso con los dientes	queso fundido	salchicha de cóctel	zanahoria cocida
Adhesividad	Propiedades adherentes detectadas en boca	clara de huevo cocida	yema de huevo cocida	queso fundido
Olor				
Cabra	Olor a cabra detectado con la nariz	ausencia	intensidad media	intensidad alta
Vegetal	Olor a vegetales detectado con la nariz	ausencia	intensidad media	intensidad alta
Sabor				
Leche de cabra	Sensación bucal relacionada con leche de cabra	ausencia	intensidad media	intensidad alta
Sabor amargo	Sensación bucal relacionada con productos amargo	ausencia	intensidad media	intensidad alta
Sabor salado	Sensación bucal producida por la sal	ausencia	intensidad media	intensidad alta
Puntuación global	Puntuación final del queso relacionada con todos los atributos	ausencia	intensidad media	intensidad alta

IV.2. 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*)

IV.2.1. Coagulante vegetal y cultivos iniciadores

El extracto acuoso de coagulante vegetal se obtuvo mediante la suspensión de 200 g de flores molidas de cardo (*C. cardunculus*) en 800 mL de agua durante 10 min. El extracto resultante se filtró a través de un paño de quesería y se centrifugó (Kubota 2010, Tokio, Japón) a $1.252 \times g$ durante 10 min. El sobrenadante se filtró a través de papel de filtro y se mantuvo a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Se utilizaron tres tipos de cultivos iniciadores comerciales: bacterias termófilas, *Micrococcus*, *Geotrichum* y levaduras ('Iota Vacherin' COQUARD, Villefranche-sur-Saône, Francia); *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Brevibacterium* y levaduras (Abiasa 'tipo Torta', Pontevedra, España) y *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* y *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* ('RST-743', Christian Hansen, Hørsholm, Dinamarca). Los cultivos Iota Vacherin y Abiasa están disponibles en forma de polvo y son cultivos para maduración mientras que el cultivo Cr-H RST-743 está disponible en forma de gránulos congelados y es un cultivo para acidificación.

Las dosis de los diferentes cultivos fueron 26, 80 y 6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de leche para Iota Vacherin, Abiasa y Cr-H RST-743, respectivamente, siguiendo las especificaciones del fabricante. Se elaboraron cinco tipos de queso usando estos cultivos y/o sus mezclas: (A) Iota Vacherin; (B) Abiasa; (C) Cr-H RST-743; (D) Iota Vacherin + Cr-H RST-743; (E) Abiasa + Cr-H RST-743.

IV.2.2. Elaboración de quesos y toma de muestras

La fabricación de los diferentes tipos de queso se realizó en una cuba doble cero de 12 L (Pierre Guerin Technologies, Mauzé, Francia) en la Planta Piloto de Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Murcia con leche pasteurizada de cabra Murciano-Granadina. El contenido medio de proteína, grasa y materia seca de la leche fue de 30.4 ± 0.3 , 53.5 ± 0.7 y $138.6 \pm 0.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, respectivamente. Se pasteurizó la leche a $78 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 s en un intercambiador de calor de placas (100 L Alfa Laval, Lund, Suecia) el día antes de la fabricación de queso y se mantuvo a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta el momento de su utilización. La leche de cabra se calentó hasta una temperatura constante de $28 \text{ }^\circ\text{C}$. Posteriormente y mientras se agitaba la leche lentamente, se añadieron 3.6 mL de CaCl_2 (Chr. Hansen, Hørsholm, Dinamarca) a una concentración de $510 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ y los diferentes cultivos iniciadores. Se agitó durante 30 min más y después se adicionó el coagulante vegetal (45 g flores por 100 L de leche).

T_{max} es un parámetro óptico derivado del sensor óptico CoAguLite™ (Reflectronics Inc., Lexington, KY, EE.UU.) e indica el tiempo desde la adición de la enzima hasta el máximo de la primera derivada. El tiempo de corte (T_{cut}) se determinó multiplicando T_{max} por $\beta = 3$, donde el número β corresponde a una modificación de Fagan *et al.* (2007b). Una vez alcanzado el final de la coagulación, se realizó un primer corte (20 s), seguido por un tiempo de reposo (10 min) y un segundo corte (5 min). Tras un segundo reposo de 3 min, se llevó a cabo una etapa de agitación de 15 min y se vació la cuba. La cuajada se vertió en moldes cuadrados y tras tres horas en los moldes y sin prensar y se introdujeron en salmuera ($17 \text{ }^\circ\text{Be}$ por 30-40 min). Después de 24 h a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, los quesos se

introdujeron en la cámara de maduración (12 °C y 85% de humedad relativa) durante 40 días. Cada tipo de queso (A, B, C, D y E) fue elaborado por duplicado y seis quesos de 300-400 g se obtuvieron de cada cuba. Los quesos fueron analizados a los 1, 20 y 40 días de maduración.

IV.2.3. Análisis fisicoquímico de los quesos

Todos los análisis se realizaron por duplicado. El rendimiento se expresó en litros de leche utilizados por kilogramo de queso producido. Las mediciones de pH se realizaron durante la fabricación y la maduración, mediante la suspensión de $5 \text{ g} \pm 0.1 \text{ mg}$ de queso rallado en 30 mL de agua destilada, en agitación, durante 10 min con un pHmetro Crison® (micro pH 2001, Barcelona, España) conectado a un electrodo combinado de vidrio (Crison®, 1952-2002) previamente calibrado a temperatura ambiente. El extracto seco (DM) se determinó mediante la introducción de las muestras de queso ($3 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$) en una estufa (Binder FED 115, Tuttlingen, Alemania) a 105 °C hasta peso constante (IDF, 2004). Se utilizó el método Van Gulik (ISO, 2008) para calcular el contenido de grasa. La grasa en extracto seco (FDM) se calculó mediante la fórmula: $\text{FDM} = (F \cdot 100) \text{ DM}^{-1}$, donde F es la grasa del queso (g kg^{-1}) y DM es el extracto seco (g kg^{-1}). El contenido en proteína del queso se determinó de acuerdo con el método Kjeldhal (IDF/RM, 2008). La destilación se llevó a cabo en un destilador automático Büchi (323, Flawil, Suiza). La medición se completó utilizando un valorador automático Metrohm 20 (702 SM Titrino, Flawil, Suiza). La proteína en extracto seco (PDM) se calculó mediante la fórmula: $\text{PDM} = (P \cdot 100) \text{ DM}^{-1}$, donde P es la proteína del queso (g kg^{-1}) y DM es el extracto seco (g kg^{-1}).

IV.2.4. Fracciones nitrogenadas

Las fracciones nitrogenadas se determinaron siguiendo el método descrito por Bütikofer *et al.* (1993). El nitrógeno soluble en agua (WSN), el nitrógeno soluble en ácido tricloroacético al 12% (TCASN) y el nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico al 5% (PTASN) se determinaron utilizando este método. A partir de los datos obtenidos, se calcularon tres índices proteolíticos como proporciones entre las diversas fracciones solubles y el nitrógeno total (TN), según Pereira *et al.* (2008).

IV.2.5. Análisis de textura

El análisis de perfil de textura (TPA) se realizó en un texturómetro QTS-25 (Brookfield CNS Farnell, Borehamwood, Reino Unido) equipado con una célula de carga de 25 kg y el software Texture Pro (versión 2.1). Para este análisis, se cortaron tres muestras en forma de cubo (3 cm^3) a partir de un queso sin corteza, se envolvió en papel de aluminio y se equilibró a $20 \text{ °C} \pm 0.5 \text{ °C}$ durante 3 h antes del ensayo. Las condiciones de ensayo fueron: 20 °C de temperatura ambiente, dos ciclos consecutivos de 50% de compresión, $30 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$ de velocidad constante de bajada y un punto de inicio de 0.05 N. Se determinaron los parámetros de textura (Bourne, 1978) indicados en la Fig. 5.

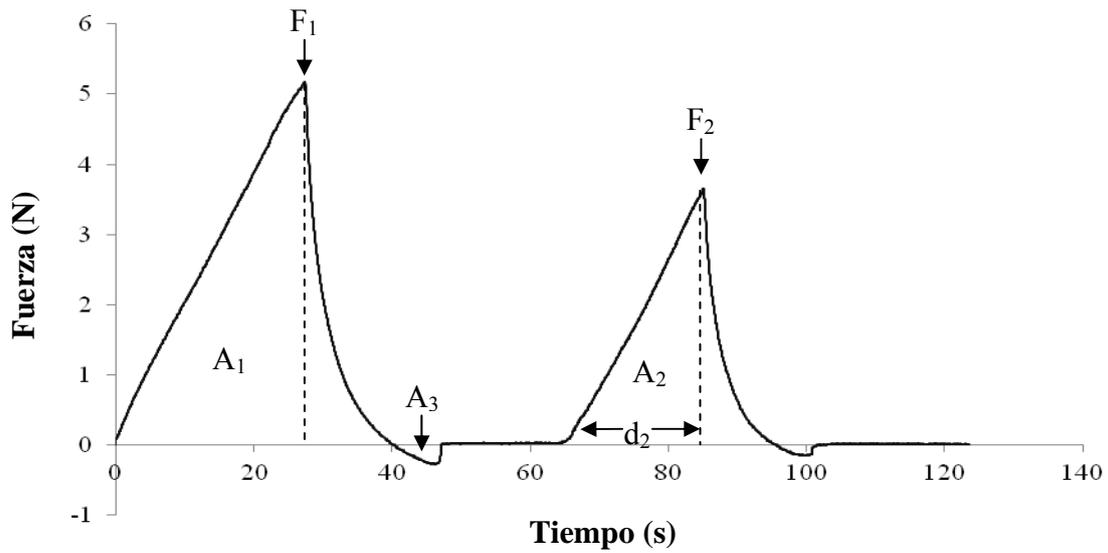


FIGURA 5. Ejemplo de un perfil de textura típico en el análisis de queso. Los parámetros de textura estudiados fueron: dureza1 y dureza2 (N, picos F_1 y F_2 , respectivamente), cohesividad (adimensional, como A_1/A_2), gomosidad (N, como $dureza1 \times cohesividad$), elasticidad (mm, distancia d_2), masticabilidad (N·mm, como $gomosidad \times elasticidad$) y adherencia (N·s, como A_3)

IV.2.6. Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los datos se realizó utilizando Minitab v15.0 (Addlink Software Científico SL, Barcelona, España). Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) para determinar las diferencias significativas entre los diferentes tipos de quesos. El análisis de componentes principales (PCA) se aplicó a los resultados de textura.

IV.3. A comparison of the use of thistle (*Cynara cardunculus* L.) and artichoke (*Cynara scolymus* L.) aqueous extracts for milk coagulation

IV.3.1. Determinación de la actividad coagulante

Ambos extractos acuosos de coagulantes vegetales (*C. cardunculus* L. y *C. scolymus* L.) se obtuvieron mediante la suspensión de 20 g de flores en 80 mL de una solución tampón a pH 5,5 (Norma IDF N° 157, 2007) durante 10 min. Este extracto se filtró a través de un paño de quesería y se centrifugó a 1.252 ×g durante 10 min (centrífuga Kubota 2010, Tokio, Japón). Una porción del sobrenadante se utilizó para determinar la actividad coagulante y el tiempo de coagulación y el resto se congeló a -18 °C. Para determinar la actividad coagulante tal como recoge la norma de la Federación Internacional de Lechería IDF (2007), se utilizó leche en polvo estándar (Milk powder for rennet testing/25 kg, Chr. Hansen, Hørsholm, Dinamarca) y pepsina (adult bovine rennet, Chr. Hansen). Se utilizaron dos métodos para caracterizar la actividad coagulante: el método Berridge y el sensor óptico CoAguLab™. El método Berridge se aplicó de acuerdo con la norma IDF (2007), y la determinación con CoAguLab™ se según lo descrito por Tabayehnejad *et al.* (2012). Se realizaron diez mediciones para cada uno de los métodos y enzimas utilizadas y se calculó la actividad total de coagulación de la leche (S_v), de acuerdo con la IDF (2007), según la siguiente fórmula:

$$S_v = \frac{t_{ref} m_{ref} V_1 D S_{adult}}{t V_{d1} V_{d2}}$$

donde t_{ref} es el tiempo de coagulación, en segundos, para la disolución del cuajo de referencia; m_{ref} es la masa, en gramos, del estándar añadido a la solución; V_1 es el volumen, en mililitros, tomada de la primera solución de referencia; D es el factor de dilución de la solución problema; S_{adult} es la actividad coagulante, en unidades internacionales de coagulación de la leche (IMCU) por gramo del estándar, t es el tiempo de coagulación, en segundos, obtenidos con la solución “problema”; V_{d1} es el volumen, en mililitros, después de la primera dilución; y V_{d2} es el volumen, en mililitros, después de la segunda dilución.

Para el cálculo de la actividad coagulante de la leche según los parámetros derivados del sensor óptico, t_{ref} es el parámetro óptico, en minutos, para la solución del cuajo de referencia y t es el parámetro óptico, en minutos, obtenido con el coagulante “problema”. Solamente los parámetros ópticos T_{max} y T_{2min} se utilizaron en esta parte del estudio (Fig. 6).

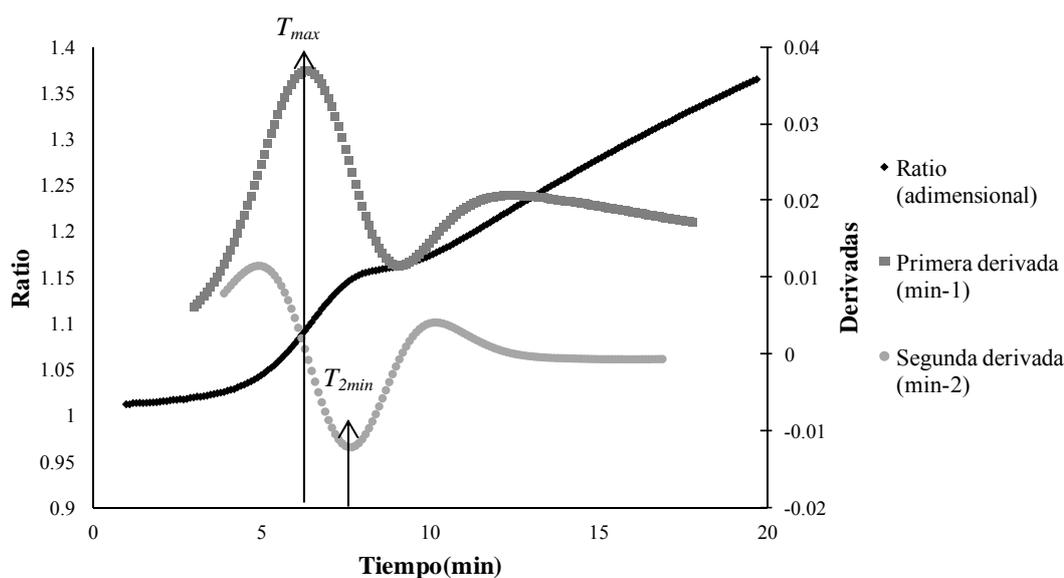


FIGURA 6. Perfil típico de retrodispersión de la luz obtenido mediante el CoAguLab™ con la leche estándar y cuajo bovino adulto, indicando los parámetros utilizados en el estudio.

IV.3.2. Determinación del tiempo de coagulación

Se utilizó leche en polvo estándar (Milk poder for rennet testing/25 kg, Chr. Hansen, Hørsholm, Dinamarca) y el tiempo de coagulación se determinó mediante rotación manual del tubo de ensayo hasta la aparición de flóculos de leche. Para calcular el tiempo de coagulación se adicionó 1 mL de coagulante a 10 mL de leche en polvo reconstituida, en diferentes condiciones: según la concentración del coagulante vegetal añadido a la leche (0.09, 0.045, 0.0225, 0.01125, 0.0045 y 0.00225 g de flores/ml de solución tampón), según la temperatura de coagulación (20, 30, 40, y 50 °C), y según el tiempo de almacenamiento en congelación (1 día y 1, 2, 3, 4, y 5 semanas de almacenamiento). La temperatura de la leche para estudiar las diferentes concentraciones y para evaluar el efecto del almacenamiento en congelación fue de 32 °C, y la concentración para estudiar los cambios según la temperatura y el efecto del almacenamiento en congelación fue

de 0,0225 g de flor/mL de tampón de solución. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

IV.3.3. Adaptabilidad tecnológica para la coagulación de la leche de cabra

La adaptabilidad tecnológica de *C. scolymus* L. y *C. cardunculus* L. fue evaluada sobre la materia prima utilizada para la fabricación de queso (leche pasteurizada de cabra Murciano-Granadina). Se realizaron las diluciones de los coagulantes vegetales como se explicó anteriormente, pero utilizando agua destilada en lugar de la solución tampón. El sensor CoAguLab™ se utilizó para comparar el comportamiento de ambos coagulantes. El nivel de calcio se incrementó con la adición de una solución (510 g·L⁻¹) de cloruro de calcio (Chr. Hansen, Francia) a 90 mL de leche de cabra pasteurizada (0.3 mL·L⁻¹) mientras ésta se atemperaba. Cuando la leche alcanzó 32 °C, se añadió coagulante vegetal a una concentración de 45 g de flor por 100 L de leche. En ese momento, el sensor CoAguLab™ comenzó el control del proceso de coagulación. Diez replicas se realizaron para cada uno de los coagulantes vegetales. Los parámetros ópticos derivados del sensor utilizados en este estudio fueron T_{max} , T_{2min} , T_{2max} , R_{max} y D_{max} (Castillo *et al.* 2003).

IV.3.4. Análisis estadístico

Se realizó el tratamiento estadístico de los datos utilizando Minitab v15.0 (AddLink Software Científico S.L. Barcelona, España). El ANOVA se utilizó para determinar diferencias significativas entre los parámetros ópticos. También se utilizó el IBM SPSS Statistics 19 (IBM España S.A, Madrid, España) para el

análisis de la regresión no lineal de la variación en el tiempo de coagulación según la concentración del coagulante.

IV.4. Physicochemical, microbiological, textural and sensory changes during the ripening of pasteurized goat milk cheese made with plant coagulant (*Cynara scolymus*)

IV.4.1. Leche, cultivo iniciador y coagulante vegetal

Se utilizó leche de cabra Murciano-Granadina en la elaboración de los quesos. Los valores medios de proteína, grasa y extracto seco de la leche fueron $3.14 \pm 0.07\%$, $5.40 \pm 0.06\%$ y $13.4 \pm 0.09\%$ (w/w), respectivamente. La leche se pasteurizó a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 s en un pasteurizador industrial en Alimer S. Coop. (Murcia, España). El cultivo iniciador utilizado ('Iota Vacherin' Coquard, Villefranche-sur-Saône, Francia) contenía bacterias termófilas, *Micrococcus* spp., *Geotrichum* spp. y levaduras. Se utilizaron flores de alcachofa (*C. scolymus*) procedentes de un campo de cultivo para la preparación del extracto coagulante, y se obtuvo el extracto siguiendo el método descrito por García *et al.* (2012) mediante la suspensión de 100 g de flores de alcachofa molidas en 900 mL de agua durante 10 min. El extracto resultante se filtró a través de un paño de quesería y se centrifugó a $1252 \times g$ durante 10 min (centrífuga Kubota 2010, Tokio, Japón). Posteriormente el sobrenadante se filtró y se conservó a $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su empleo.

IV.4.2. Elaboración de queso y toma de muestras

La elaboración de queso se llevó a cabo en la empresa 'Alimer Sociedad Cooperativa' (Lorca, Murcia, España). En primer lugar, se añadieron 80 L de

leche de cabra pasteurizada en una cuba semi-industrial de 100 L, a la que se le añadió 24 mL de CaCl₂ (Chr. Hansen, Hørsholm, Dinamarca, a una concentración de 510 g/L) y el cultivo iniciador comercial (32 mg/L de leche). A continuación, se añadió el coagulante vegetal (45 g de flores/100 L de leche) y una vez coagulada (1 hora) se realizó el corte de la cuajada (durante 4 min), seguido de una etapa de reposo de 6 min. Posteriormente, se agitó la leche durante 2 min y se dejó en reposo otros 2 min. Se realizó otra agitación de 2 min y otro reposo de 2 min y finalmente, tras otra agitación de 2 min, la cuba de queso se vació y la cuajada se moldeó en multimoldes circulares. Tras 3 horas en los moldes, la cuajada sin prensar se introdujo en salmuera al 17% durante 30-40 min. La cuajada se mantuvo entonces durante 24 horas a 4 °C, antes de introducirla en la cámara de maduración (12 °C y 85% de humedad relativa). Esta elaboración de queso se llevó a cabo el mismo día por duplicado, y se obtuvieron unos 40 quesos de 300-400 g. Se analizaron por duplicado dos quesos por elaboración y día de maduración.

IV.4.3. Análisis fisicoquímico

Todos los análisis se realizaron por duplicado según describen García *et al.* (2012). El pH se determinó mediante la suspensión en agitación de 5 g±0.1 mg de queso homogenizado en 30 mL de agua destilada durante 10 min. Las mediciones se realizaron utilizando un medidor de pH Crison® (micro pH 2001, Barcelona, España) conectado a un electrodo combinado de vidrio Crison® (1952-2002) previamente calibrado a temperatura ambiente. El extracto seco (DM) se determinó mediante la introducción de 3±0.1 g de queso en una estufa (Binder

FED 115, Tuttlingen, Alemania) a 105 °C hasta peso constante (IDF 2004). El contenido graso se analizó por duplicado según el método de Van Gulik (ISO 2008). La grasa en el extracto seco (FDM) se calculó por la fórmula $FDM = (F \times 100) / DM$, donde F es el porcentaje de grasa en el queso y DM es el porcentaje de extracto seco. El contenido de proteína del queso se calculó según el método de Kjeldahl (IDF / RM 2008), y la destilación se llevó a cabo en un destilador automático Büchi (323, Flawil, Suiza). La medición se completó utilizando un valorador automático Metrohm 20 (702 SM Titrino, Flawil, Suiza). La proteína en extracto seco (PDM) se calculó por la fórmula $PDM = (P \times 100) / DM$, donde P es el porcentaje de proteína en el queso y DM es el porcentaje de extracto seco.

IV.4.4. Fracciones nitrogenadas

El nitrógeno soluble en agua (WSN), el nitrógeno soluble en ácido tricloroacético al 12% (TCASN) y el nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico (PTASN) se determinaron siguiendo el método descrito por Bütikofer *et al.* (1993). Los resultados se muestran como proporción entre cada fracción de nitrógeno y el nitrógeno total (TN).

IV.4.5. Análisis microbiológico

El recuento de coliformes totales, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp. y *Listeria* spp. se realizaron por duplicado usando diluciones decimales en agua de peptona (Biorad, Hercules, CA, USA). Los coliformes totales se sembraron en Agar bilis rojo violeta (Laboratorios Conda, Madrid, España) y se incubaron a 30 °C durante 24 h (AFNOR 2009). El recuento de *E. coli* se realizó en el medio Rapid *E. coli*

(Biorad) incubado a 45 °C durante 24 h (AFNOR 1993). Para la determinación del contenido de *Staphylococcus* spp. se realizó una siembra en el medio Baird Parker (Biorad) y se incubó a 37 °C durante 24-48 h (AFNOR 2004). *Listeria* spp. se cuantificó según la norma ISO 11290 (1996).

IV.4.6. Análisis de textura

El análisis de perfil de textura (TPA) se realizó según García *et al.* (2014) usando un analizador de textura QTS-25 (Brookfield CNS Farnell, Borehamwood, Hertfordshire, UK) equipado con una célula de carga de 25 kg y el software Texture Pro v. 2.1 (Brookfield CNS Farnell, Borehamwood, Hertfordshire, UK). Tres horas antes de la prueba, se cortaron tres muestras en forma de cubo (3cm³) de un queso sin corteza, se envolvieron en papel de aluminio y se atemperaron a 20±0.5 °C hasta su análisis. Las condiciones de TPA fueron las siguientes: 20 °C de temperatura ambiente; dos ciclos consecutivos de compresión de 50%; velocidad de bajada constante de 30 mm/min y punto de inicio de 0,05 N. Las variables de textura dureza (expresada como N), gomosidad (expresado como N), masticabilidad (expresado como N mm), cohesividad (adimensional), elasticidad (expresado como mm) y adhesividad (expresado como N s) se calcularon como se describe en Bourne (1978).

IV.4.7. Análisis sensorial

La evaluación sensorial se realizó en una sala equipada para el análisis sensorial, en el departamento de Tecnología de la Universidad de Murcia, entre las 10 y las 12 de la mañana por un panel sensorial formado por 10 panelistas entrenados. El

análisis sensorial (ISO 2005) se realizó después de un entrenamiento previo en el que cada parámetro se definió y cuantificó. En cada día de muestreo (15, 45 y 75 días), el queso se dividió en dos partes: una se dividió en trozos de aproximadamente 1 cm de espesor, mientras que la otra mitad se usó para la fase visual de las pruebas. A cada panelista se le sirvieron las muestras de queso a 20-25 °C en un plato de plástico codificado. Los panelistas tenían a su disposición Manzanas Granny Smith, galletas y agua mineral natural (Aliada, El Corte Inglés, Madrid, España) para limpiar el paladar entre las muestras. Las muestras se presentaron de tal forma que se evitó la influencia del orden y del gusto residual (Macfie *et al.* 1989). Una escala continua no estructurada (escala de 10 puntos) se utilizó para evaluar los descriptores sensoriales y la puntuación global, que van desde la intensidad más baja (0) a la más alta (10) de cada atributo.

IV.4.8. Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los datos se realizó con Minitab v15.0 (Addlink Software Científico, S.L. Barcelona, España). Se utilizó un modelo lineal para determinar si existían diferencias significativas en los diferentes tiempos de maduración. La correlación de Pearson se utilizó para correlacionar texturas sensoriales e instrumentales y la puntuación total con los otros descriptores sensoriales.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ARTÍCULO V.1

Improvements in goat milk quality: A review

García V, Rovira S, Boutoial K y López M B

Small Ruminant Research **121** (2014) 51-57

URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.12.034>

Abstract: New methods developed for increasing goat milk and cheese quality, such as the introduction of plant by-products in the goat diet and the development of new sensors for quality control and the development of new added value products, have led to increased consumption of the same.

This review focuses on recent studies related with improvements in goat milk quality and provides an overview of the possibilities that have been tested and confirmed as providing promising results.

Coautores:

Dra. Silvia Rovira

-Profesora bilingüe en Colegio Nelva-Monteagudo

-*Dirección:* Carril de la Condomina, 11, 30006 Murcia, España

-*Correo electrónico:* silvia.rovira@um.es

Dr. Khalid Boutoial

-Profesor asociado en la Universidad Sultan Moulay Slimane

-*Dirección:* Escuela Superior de Tecnología, Universidad Sultan Moulay Slimane, Bd Ibn Khaldoun, Beni-Mellal 23000, Marruecos

-*Correo electrónico:* boutoial@ yahoo.fr

Dra. María Belén López

-Profesora Titular de la Universidad de Murcia

-*Dirección:* Departamento de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Campus de Espinardo, Universidad de Murcia 30100, Murcia, España

-*Correo electrónico:* mbelen@um.es

ARTÍCULO V.2

Effect of vegetable coagulant, microbial coagulant and calf rennet on physicochemical, proteolysis, sensory and texture profiles of fresh goat cheese

García V, Rovira S, Teruel R, Boutoial K, Rodríguez J, Roa I y López M B

Dairy Science and Technology **92** (2012) 691-707

URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s13594-012-0086-1>

Abstract: In order to determine the technological suitability of vegetable coagulants for the manufacture of cheeses, two different aqueous extracts from cardoon (*Cynara cardunculus* subsp. *flavescens* and *C. cardunculus* subsp. *cardunculus*) and microbial coagulant (*Mucor miehei*) were compared with calf rennet. Optical sensors showed that the microbial coagulant had the highest clotting time (T_{max}) whereas both rennet and vegetable coagulants had similar and lower milk clotting times. For most of the physicochemical (Colour CIELab, protein and fat) and textural (cohesiveness and springiness) parameters, no differences were observed between the different enzymes assayed. However, dry matter content, hardness, gumminess and chewiness showed significant differences, higher values being obtained in cheeses made with vegetable coagulants. As regards sensory properties, cheeses made with vegetable coagulants showed less firmness and whiteness but higher bitterness while microbial coagulant and calf rennet showed similar and higher values. No statistically significant differences were found in the soluble nitrogen or non-protein nitrogen fractions between the cheeses. The vegetable coagulants showed higher intensity bands in the Pre- α_s casein region, which was related to higher α_s -casein proteolytic rates. The use of vegetable coagulants should enable

manufacturers to produce fresh cheeses with new textural features, but to improve sensory profile, different technological strategies might be adopted.

Coautores:

Dra. Silvia Rovira

-Profesora bilingüe en Colegio Nelva-Montegudo
-*Dirección:* Carril de la Condomina, 11, 30006 Murcia, España
-*Correo electrónico:* silvia.rovira@um.es

Dr. Khalid Boutoial

-Profesor asociado en la Universidad Sultan Moulay Slimane
-*Dirección:* Escuela Superior de Tecnología, Universidad Sultan Moulay Slimane, Bd Ibn Khaldoun, Beni-Mellal 23000, Marruecos
-*Correo electrónico:* boutoial@yahoo.fr

Dra. Rocio Teruel

-Técnico responsable de análisis sensorial en Merieux nutriScience
-*Dirección:* Merieux NutriSciences. Silliker Iberica S A U. Calle Fuenterrabía, 7. 28014 Madrid, España
-*Correo electrónico:* rocio.teruel@mxns.com

D. Joaquín Rodríguez

- Investigador del Instituto Tecnológico Agroalimentario de Extremadura (INTAEX)
-*Dirección:* Instituto Tecnológico Agroalimentario de Extremadura (INTAEX). Avenida Adolfo Suárez, s/n. Apartado 20107 06071 Badajoz, España.
-*Correo electrónico:* joaquin.rodriguez@gpex.es

Dr. Isidro Roa

-Investigador del Instituto Tecnológico Agroalimentario de Extremadura (INTAEX)
-*Dirección:* Instituto Tecnológico Agroalimentario de Extremadura (INTAEX). Avenida Adolfo Suárez, s/n. Apartado 20107 06071 Badajoz, España.
Correo electrónico: isidro.roa@juntaextremadura.net

Dra. María Belén López

-Profesora Titular de la Universidad de Murcia
-*Dirección:* Departamento de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Campus de Espinardo, Universidad de Murcia 30100, Murcia, España
-*Correo electrónico:* mbelen@um.es

ARTÍCULO V.3

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*)

García V, Rovira S, Boutoial K, Ferrandini E y López M B

Journal of the Science of Food and Technology **94** (2014) 552-559

URL: <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.6292>

Abstract:

BACKGROUND: The increase in the demand for goat's cheese throughout the world has encouraged research into the development of new related products with different textural characteristics. The aim of this work was to study the effect of three commercial starter cultures through the assessment of physicochemical and textural characteristics of goat's milk cheeses made with vegetable coagulant (*Cynara cardunculus*) during ripening.

RESULTS: Use of the different starter cultures produced a significant effect ($P < 0.05$) on moisture, proteins, pH, nitrogen fractions and hardness of the cheeses. Results show that the addition of mesophilic starters ensures the correct acidification rate and produced cheeses with lower pH values and greater hardness. Use of thermophilic starter cultures produces cheeses with less instrumental hardness and the use of mixed cultures produced less proteolysis.

CONCLUSION: These results are found useful for selecting the most suitable starter for the development of new goat's cheeses.

Coautores:

Dra. Silvia Rovira

-Profesora bilingüe en Colegio Nelva-Monteagudo
-*Dirección:* Carril de la Condomina, 11, 30006 Murcia, España
-*Correo electrónico:* silvia.rovira@um.es

Dr. Khalid Boutoial

-Profesor asociado en la Universidad Sultan Moulay Slimane
-*Dirección:* Escuela Superior de Tecnología, Universidad Sultan Moulay Slimane, Bd Ibn Khaldoun, Beni-Mellal 23000, Marruecos
-*Correo electrónico:* boutoial@ yahoo.fr

Dr. Eduardo Ferrandini

-Profesor contratado doctor de la Universidad de Murcia
-*Dirección:* Departamento de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Campus de Espinardo, Universidad de Murcia 30100, Murcia, España
-*Correo electrónico:* eferrand@um.es

Dra. María Belén López

-Profesora Titular de la Universidad de Murcia
-*Dirección:* Departamento de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Campus de Espinardo, Universidad de Murcia 30100, Murcia, España
-*Correo electrónico:* mbelen@um.es

ARTÍCULO V.4

A comparison of the use of thistle (*Cynara cardunculus* L.) and artichoke (*Cynara scolymus* L.) aqueous extracts for milk coagulation

García V, Rovira S, Boutoial K, Álvarez D y López M B

Dairy Science and Technology **95** (2015) 197-208

URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s13594-014-0197-y>

Abstract: Plant coagulants may offer a wide range of possibilities for cheese production, but before they can be used on an industrial scale, an in-depth study needs to be made concerning their suitability for cheese making and their effect on the coagulation process. The aims of this study were to determine the clotting activity of two plant coagulants in standard milk, to study the influence of different conditions (coagulant concentration, temperature, and frozen storage) on the coagulation of standard milk, and to compare the technological behavior of artichoke and thistle coagulants in goat milk. The coagulant activity of artichoke extract (46 IMCU mL⁻¹) was lower than that of thistle extract (61 IMCU mL⁻¹). Both extracts behaved similarly in the different conditions mentioned above in standard milk, and both can be used to curdle goat milk with no significant differences. The results point to similar rates of micellar aggregation for both plant coagulants, suggesting that artichoke could be used as an alternative coagulant to thistle for cheese making.

Coautores:

Dra. Silvia Rovira

-Profesora de secundaria y bachillerato bilingüe en Colegio Nelva-Monteagudo

-*Dirección:* Carril de la Condomina, 11, 30006 Murcia, España

-*Correo electrónico:* silvia.rovira@um.es

Dr. Khalid Boutoial

-Profesor asociado en la Universidad Sultan Moulay Slimane

-*Dirección:* Escuela Superior de Tecnología, Universidad Sultan Moulay Slimane, Bd Ibn Khaldoun, Beni-Mellal 23000, Marruecos

-*Correo electrónico:* boutoial@yahoo.fr

Dr. Daniel Álvarez

-Profesor asociado a tiempo parcial de la Universidad de Murcia

-*Dirección:* Departamento de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Campus de Espinardo, Universidad de Murcia 30100, Murcia, España

-*Correo electrónico:* dalvarez@um.es

Dra. María Belén López

-Profesora Titular de la Universidad de Murcia

-*Dirección:* Departamento de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Campus de Espinardo, Universidad de Murcia 30100, Murcia, España

-*Correo electrónico:* mbelen@um.es

ARTÍCULO V.5

Physicochemical, microbiological, textural and sensory changes during the ripening of pasteurised goat milk cheese made with plant coagulant (*Cynara scolymus*)

García V, Rovira S, Boutoial K, Ferrandini E y López M B

International Journal of Dairy Technology **68** (2015)

URL: <http://dx.doi.org/10.1111/1471-0307.12225>

Abstract: This study describes the changes that occur during the ripening of cheeses made with a plant coagulant derived from artichoke flowers (*Cynara scolymus*). The results indicate that the physicochemical composition during ripening evolves similarly to other cheeses. The texture and sensory features of the cheeses during ripening evolved differently from that observed for other goat cheeses. Although it is common for a bitter taste to develop during the ripening of cheeses elaborated with plant coagulants, bitterness was scored very low in the cheeses made with artichoke, so that these cheeses could be suitable for marketing.

Coautores:

Dra. Silvia Rovira

-Profesora bilingüe en Colegio Nelva-Monteagudo

-Dirección: Carril de la Condomina, 11, 30006 Murcia, España

-Correo electrónico: silvia.rovira@um.es

Dr. Khalid Boutoial

-Profesor asociado en la Universidad Sultan Moulay Slimane

-Dirección: Escuela Superior de Tecnología, Universidad Sultan Moulay Slimane, Bd Ibn Khaldoun, Beni-Mellal 23000, Marruecos

-Correo electrónico: boutoial@yahoo.fr

Dr. Eduardo Ferrandini

-Profesor contratado doctor de la Universidad de Murcia

-*Dirección:* Departamento de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Campus de Espinardo, Universidad de Murcia 30100, Murcia, España

-*Correo electrónico:* eferrand@um.es

Dra. María Belén López

-Profesora Titular de la Universidad de Murcia

-*Dirección:* Departamento de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Campus de Espinardo, Universidad de Murcia 30100, Murcia, España

-*Correo electrónico:* mbelen@um.es

VI. RESUMEN GLOBAL

En un sistema de mercado global como en el que vivimos en la actualidad, las industrias en general y la industria quesera en particular, buscan, a través de la investigación, el desarrollo de nuevos productos diferenciados del resto que les permitan diferenciarse en el competitivo nicho de mercado de la industria quesera. Aunque los quesos de cabra son habituales en el mercado, la utilización de coagulantes vegetales nos permite ofrecer al consumidor una variedad diferenciada de sabores y texturas.

El primer artículo de esta Memoria de Tesis Doctoral consiste en una revisión relacionada con las mejoras en la calidad de la leche de cabra y sus productos derivados como el queso. En este artículo se repasan los criterios (sanitarios, nutricionales, tecnológicos y sensoriales) que se deberían controlar para obtener una leche de calidad y cómo actuar para mejorarlos. También se revisan algunas técnicas de control de procesos durante la elaboración del queso como el uso de sensores ópticos y los tratamientos con altas presiones. Para finalizar y en relación con el contenido de la presente Tesis Doctoral, se describe la utilización de coagulantes vegetales y de fermentos durante la elaboración quesera como posible fuente de innovación en el mercado de la industria quesera.

El primer objetivo de esta Memoria de Tesis Doctoral (*“Comparar la influencia de diferentes coagulantes en los parámetros fisicoquímicos, sensoriales, proteolíticos y de textura de un queso fresco de cabra, para determinar su adaptabilidad tecnológica para la elaboración de queso de cabra”*), se aborda en el artículo titulado *“Effect of vegetable coagulant, microbial coagulant and calf rennet on physicochemical, proteolysis, sensory and texture profiles of fresh goat cheese”* que se recoge en el apartado V.2 de esta Memoria de Tesis Doctoral. En

este artículo se comparan 3 diferentes enzimas coagulantes (dos extractos de cardo diferentes (*Cynara cardunculus* subsp. *cardunculus* (V₁) y *C. cardunculus* subsp. *flavescens* (V₂)) y un coagulante microbiano (M)) con el cuajo animal de ternera (A) durante la elaboración de queso fresco de leche de cabra y su efecto en las propiedades finales de los quesos elaborados.

Mediante el empleo de sensores ópticos y del parámetro derivado T_{max} se observó que el coagulante microbiano tenía el mayor tiempo de coagulación (12.2 min) y el coagulante vegetal V₂ el menor (4.87 min), mientras que el coagulante vegetal (V₁) y el cuajo animal (A) mostraron tiempos intermedios y similares entre ellos durante el proceso de coagulación. Todas las enzimas coagulantes utilizadas se emplearon a una concentración que asegurase la obtención en leche estándar del mismo tiempo de coagulación, por lo que las diferencias encontradas en leche de cabra para los valores de T_{max} pueden ser debidas a un alto grado de proteólisis inespecífica (Castillo *et al.*, 2002) de la enzima microbiana. Los valores inferiores de T_{max} de los coagulantes vegetales pueden ser asociados a la alta capacidad hidrolítica de los coagulantes vegetales (Macedo y Malcata, 1997).

De los parámetros fisicoquímicos estudiados en los quesos, tan solo el extracto seco mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) según el tipo de coagulante utilizado, indicando que los quesos M y V₂ obtienen diferencias entre ellos. A pesar que el uso de diferentes coagulantes puede afectar a la estructura del queso e influir en el desuerado, en este caso, como no hubo diferencias en la humedad en la fracción no grasa, las diferencias observadas parece que estuvieron influenciadas por la concentración de grasa en el queso.

Se analizaron mediante electroforesis las caseínas extraídas y aisladas de cada uno de los tipos de queso para determinar el grado de hidrólisis de las mismas. Mediante la electroforesis en geles de poliacrilamida con urea (Urea-PAGE) se identificaron de forma cualitativa las β - y α_s -caseínas y diversos productos de la degradación de la α_s -caseína. La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) se realizó para identificar los productos de degradación de la β -caseína y se observó que las regiones de la γ -caseína (producto de degradación de las β -caseína) eran claramente más intensas en los coagulantes vegetales utilizados (V_1 y V_2). Los resultados derivados de este estudio demostraron la existencia de una mayor tasa de formación de productos de degradación de las α_s - y las β -caseínas en los quesos elaborados con coagulantes vegetales, que coincide con los resultados publicados por Roseiro *et al.* (2003).

Para determinar de forma cuantitativa el grado de hidrólisis de las caseínas, se realizó una separación mediante electroforesis capilar. Los resultados indicaron diferencias significativas en los productos de degradación de las caseínas (Pre- α_s -caseínas y ρ - κ -caseínas), siendo superiores en los quesos elaborados con coagulantes vegetales (V_1 y V_2) que en los elaborados con el coagulante microbiano (M) y con el cuajo animal (A). Así mismo, los valores de Pre- α_s -caseínas fueron superiores en los quesos elaborados con coagulante microbiano (M) que en los obtenidos a partir de cuajo animal (A). Estos resultados confirman lo observado con anterioridad y coincide con diversos estudios que señalan que los coagulantes vegetales hidrolizan en mayor grado las α_s - y β -caseínas que el cuajo animal y las enzimas coagulantes microbianas debido a su alta actividad

proteolítica y a una especificidad diferente (Macedo y Malcata, 1997; Sousa *et al.*, 2001; Galán *et al.*, 2008).

Al realizar el análisis de color instrumental no se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros de color estudiados (L^* , a^* y b^*). Sin embargo, el análisis de textura instrumental sí que mostró diferencias en algunos de sus parámetros. Se determinó que los quesos frescos elaborados con coagulantes vegetales (V_1 y V_2) eran más duros, gomosos y con una mayor masticabilidad que los elaborados con coagulante microbiano o cuajo animal, con valores superiores y estadísticamente significativos para el coagulante vegetal V_1 en todos los parámetros. Este hecho puede ser debido a una disminución en el contenido de humedad, que afectaría a los tres parámetros texturales mencionados anteriormente (Calvo *et al.*, 2007; Pinto *et al.*, 2011).

En el análisis sensorial realizado a los quesos se valoraron los siguientes parámetros: apariencia (color/blanco), textura (rugosidad, humedad, elasticidad, firmeza y adhesividad), aroma (a cabra o a vegetal), sabor (cabra, amargo y salado) y valoración global, todos ellos valorados en una escala del 1 al 10. Los resultados sobre la apariencia indicaron que los quesos elaborados con coagulantes vegetales presentaban una menor blancura que los elaborados con el cuajo animal o el coagulante microbiano. La rugosidad, la humedad, la elasticidad y la adhesividad no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes quesos analizados. Sin embargo, para el parámetro firmeza sí que se determinaron diferencias significativas, con valores inferiores para los quesos elaborados con coagulantes vegetales (V_1 y V_2). Para los parámetros relacionados con el aroma y los parámetros salado y sabor a cabra no se observaron diferencias

significativas entre los quesos fabricados, mientras que para los relacionados con el sabor amargo, se observó que los quesos elaborados con los coagulantes vegetales obtuvieron valores más elevados. La valoración global otorgada a cada uno de los quesos mostró que los quesos elaborados con coagulante vegetal fueron peor puntuados que los elaborados con coagulante microbiano o cuajo animal. La mayor percepción del sabor amargo en los quesos está relacionada con una mayor hidrólisis de las β -caseínas, como indica Mendiola (2000) y se ha confirmado con los resultados de este estudio. Asimismo, parece existir una relación directa entre una menor valoración global y el amargor producido por el uso de estos coagulantes.

Para intentar resolver las dificultades encontradas en los resultados del empleo de los coagulantes vegetales en la elaboración de quesos de leche de cabra se propuso un segundo estudio titulado “*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)*” (reflejado en el apartado V.3) en el que se elaboraron quesos de cabra curados con diferentes cultivos iniciadores. Mediante este artículo se alcanzaría el segundo objetivo de esta Memoria de Tesis Doctoral “*Evaluar las características fisicoquímicas, proteolíticas y de textura en quesos de leche de cabra pasteurizada elaborados con coagulante vegetal (Cynara cardunculus L.) y estudiar la influencia de diferentes cultivos iniciadores comerciales durante la maduración del queso de cabra.*”. En este trabajo se elaboraron 5 tipos de queso de leche de cabra coagulados con coagulante vegetal en los que se utilizaron diferentes cultivos iniciadores de forma individual o en combinación. Los cultivos iniciadores

empleados fueron: (A) Iota Vacherin, (B) Abiasa, (C) Cr-H RST-743, (D) Iota Vacherin + Cr-H RST-743 y (E) Abiasa + Cr-H RST-743. También se estudió la influencia del tiempo de maduración sobre los quesos, analizándose a 1, 20 y 40 días de maduración.

Los valores de rendimiento queso solamente mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los quesos elaborados con el fermento Abiasa (B) y la mezcla (D), que pudo ser debido a una menor acidificación producida en el queso (B). Se estudió la evolución del pH durante la elaboración, observándose que este parámetro permanecía prácticamente estable a lo largo del proceso en los quesos con los fermentos termófilos (A y B), mientras que en los quesos a los que se les añadió bacterias mesófilas ácido-lácticas (C, D y E) el pH disminuyó de forma marcada. Este comportamiento coincide con lo observado por Poveda *et al.* (2003).

En relación a la composición fisicoquímica de los quesos, los resultados confirmaron la existencia de diferencias significativas entre los quesos para todas las variables estudiadas. El pH se vio afectado tanto por el tipo de fermento utilizado ($P < 0.001$) como por el tiempo de maduración ($P < 0.05$), claramente influenciado por la acción de los fermentos. La humedad varió de forma estadísticamente significativa ($P < 0.001$) según el tipo de fermento utilizado y el tiempo de maduración, posiblemente debido a los cambios acontecidos en la estructura tridimensional, la presión osmótica y la sinéresis que tiene lugar durante la maduración (Pinto *et al.*, 2011; Zerfiridis, 2001). La grasa en relación al extracto seco no se vio modificada de forma significativa por el tipo de fermento utilizado, pero sí lo hizo por el tiempo de maduración de los quesos,

posiblemente debido a la disminución del contenido de agua, lactosa y proteína que tiene lugar durante el proceso de maduración de los quesos (Poveda *et al.*, 2003). El contenido proteico en relación al extracto seco difirió entre los quesos de forma estadística según el fermento utilizado ($P < 0.01$) y el tiempo de maduración ($P < 0.001$) debido a la diferente proteólisis de cada uno de los fermentos (Poveda *et al.*, 2003).

Respecto a las diferentes fracciones nitrogenadas estudiadas, los resultados indicaron que tanto la fracción soluble en agua (WSN), la fracción soluble en ácido tricloroacético (TCASN) y la fracción soluble en ácido fosfotúngstico (PTASN) se vieron modificadas en función del tipo de fermento utilizado, obteniéndose una mayor actividad proteolítica en el fermento (C) debido posiblemente a la temperatura de elaboración del queso (28 °C). Por otro lado, la mezcla de fermentos disminuyó el grado de hidrólisis de las proteínas, indicando un posible efecto antagónico. El tiempo de maduración influyó de forma significativa ($P < 0.001$) a las tres fracciones nitrogenadas estudiadas.

Tras realizar los análisis de textura de todos los quesos a los diferentes tiempos de maduración se realizó un análisis de componentes principales así como una correlación de Pearson con el fin de comprender mejor la evolución de los diferentes parámetros. Los resultados mostraron que los dos primeros componentes explicaban más del 85% de las variaciones observadas y que el primer componente estaba relacionado con el tiempo de maduración (con un 51.7 %) y el segundo con el tipo de fermento (con un 34.9 %) indicando que los cambios que tienen lugar durante la maduración influyen de forma significativa en el perfil de textura. Así mismo, se determinó que el tiempo de maduración afectó

más a los parámetros de cohesividad, gomosidad, masticabilidad y elasticidad, mientras que el tipo de fermento influyó sobre la dureza 1 y la dureza 2, hecho que coincide con lo determinado por Pappa *et al.* (2007). Los resultados derivados de este estudio son de gran utilidad para la selección de cultivos iniciadores en aquellos quesos que se elaboren con coagulante vegetal.

Como se ha indicado en la sección de antecedentes, además del cardo, se puede utilizar el coagulante vegetal derivado de la flor de la alcachofa en la elaboración quesera. Para comprobar el efecto coagulante de este producto realizamos un tercer trabajo (*“A comparison of the use of thistle (Cynara cardunculus L.) and artichoke (Cynara scolymus L.) aqueous extracts for milk coagulation”*), que se refleja en el apartado V.4) con el fin de abordar el siguiente objetivo: *“Comparar el uso de extractos acuosos de cardo (Cynara cardunculus L.) y alcachofa (Cynara scolymus L.) para la coagulación de la leche”*.

Para la comparación de ambos extractos coagulantes, el primer paso fue determinar la actividad coagulante total de cada uno de los extractos crudos, pues la mayoría de estudios están realizados sobre extractos purificados de proteasas aspárticas. Para tal fin se utilizó el método de Berridge y de forma paralela el sensor CoAguLabTM. Con ambos métodos se observó que la fuerza del extracto coagulante de alcachofa (61 IMCU's/mL) es ligeramente inferior a la mostrada por el extracto de cardo (46 IMCU's/mL), coincidiendo con lo referenciado por Mendiola (2000).

Una vez determinada la actividad coagulante de cada uno de los extractos, se determinó la influencia de diferentes condiciones de coagulación (temperatura y

concentración) y la determinación de las diferentes cinéticas de coagulación, utilizando para ello un sustrato de leche en polvo estándar. Los resultados indicaron que a pesar que el extracto de flores de alcachofa tardaba un poco más en coagular la leche, el comportamiento cinético fue muy similar entre ambos extractos. Posteriormente, se realizó la coagulación a diferentes temperaturas con una misma concentración de cada una de los extractos y, de nuevo se confirmó un comportamiento similar en las variaciones del tiempo de coagulación según la temperatura, hecho que coincide con lo encontrado por otros autores (Dybowska y Fujio, 1996; Chazarra *et al.*, 2007). Finalmente se estudió si la conservación en congelación de los extractos vegetales influía en la capacidad coagulante de los mismos. Los resultados fueron sorprendentes, ya que se observó que el tiempo de coagulación disminuía conforme aumentaba el tiempo que se mantenían los coagulantes en congelación, al contrario que lo observado por Tavaría *et al.* (2001). Por lo tanto, este hecho sugiere que mantener los coagulantes en congelación no solamente asegura una buena calidad microbiológica de los extractos, sino que además, se obtiene un producto con una mayor actividad coagulante.

Para finalizar este estudio se realizó un estudio comparado de ambos extractos en leche de cabra empleando el sensor de reflectancia difusa CoAguLabTM. Los resultados mostraron que a pesar de que las gráficas obtenidas por cada uno de los coagulantes eran ligeramente diferentes entre ellas, los parámetros derivados (T_{max} , T_{2max} , T_{2min} , R_{max} , R_{min} y D_{max}) no mostraron diferencias significativas entre ambos extractos. Los valores de T_{max} , T_{2max} y T_{2min} permiten la comparación de diferentes condiciones de elaboración y la determinación de la adaptabilidad

tecnológica de los coagulantes (Castillo, 2001) por lo que la ausencia de diferencias significativas indica que ambos extractos coagulantes obtendrían cuajadas similares en la elaboración de queso de leche de cabra. La ausencia de diferencias en los valores de R_{max} era esperada ya que según Castillo (2001) este valor está condicionado por variaciones en la temperatura. En cuanto al valor D_{max} , relacionado directamente con la hidrólisis y agregación de las caseínas e inversamente con las variables T_{max} , T_{2max} y T_{2min} , la ausencia de diferencias significativas indicó que ambos coagulantes presentaron ratios de hidrólisis de la κ -caseína y de agregación micelar similares durante la coagulación. Estos hechos coinciden con lo descrito por Sidrach *et al.* (2005), quienes determinaron que el grado de hidrólisis de las α -, β - y κ -caseínas es similar en coagulantes derivados de la flor del cardo y de la alcachofa.

Una vez determinado que el uso de ambos coagulantes vegetales permite la obtención de cuajadas similares, se estudió la posible aplicación del coagulante de alcachofa para la elaboración quesera, dentro del cuarto y último objetivo de esta tesis doctoral: *“Estudiar los cambios fisicoquímicos, texturales, microbiológicos y sensoriales que se producen durante la maduración de un queso de cabra elaborado con un coagulante de extracto acuoso de alcachofa y un cultivo iniciador comercial a nivel semi-industrial”* que se corresponde con el artículo titulado *“Physicochemical, microbiological, textural and sensory changes during the ripening of pasteurised goat milk cheese made with plant coagulant”* (reflejado en el apartado V.5).

Se realizaron a nivel semi-industrial elaboraciones de queso de leche de cabra pasterizada utilizando coagulante vegetal de alcachofa y el cultivo iniciador *“Iota*

Vacherin” (caracterizado en el segundo artículo). La maduración del queso afectó a todos los parámetros fisicoquímicos estudiados, excepto el contenido de grasa en el extracto seco (FDM) que no presentó diferencias significativas ($P > 0.05$) indicando que el aumento de la grasa total se debió a la disminución del agua en el queso. Tanto la humedad como la actividad de agua disminuyeron a lo largo de la maduración por la pérdida de agua a través de la superficie del queso (Bontinis *et al.*, 2008), la acción de los microorganismos o la presión osmótica de la sal. El pH aumentó a lo largo de la maduración, posiblemente debido a la deacidificación producida por las levaduras presentes en el cultivo iniciador. El contenido proteico aumentó a lo largo de la maduración, hecho que no coincide con lo encontrado por otros autores (Bontinis *et al.*, 2008; García *et al.*, 2012). En relación a las fracciones nitrogenadas estudiadas (WSN, TCASN y PTASN) variaron durante el periodo de maduración. El aumento de la fracción del nitrógeno soluble en agua (WSN) pudo ser debido a la actividad residual del coagulante vegetal. La fracción de nitrógeno soluble en tricloroacético (TCASN) aumentó durante los primeros 45 días, para después estabilizarse coincidiendo con lo señalado por Tejada *et al.* (2008). Finalmente, la fracción de nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico (PTASN) evolucionó igual que la fracción TCASN, debido sobre todo a la acción de los microorganismos.

Los resultados del análisis microbiológico mostraron la ausencia en los quesos de los microorganismos patógenos *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus coagulasa-positivos* confirmando las buenas prácticas de elaboración empleadas durante la elaboración de los mismos. Los valores de coliformes totales, aumentaron de los 15 a los 45 días, pero disminuyeron hasta los 75 días,

alcanzando los valores más bajos en este momento de la maduración. Los resultados observados en el recuento de *Escherichia coli* indican que de los 15 a los 45 días se produjo una disminución de este microorganismo, seguido por un aumento a los 75 días. La presencia de estos microorganismos puede ser debida al uso del coagulante vegetal (Fernández-Salguero *et al.*, 2002) o a una mala manipulación del producto. Sin embargo, los valores son inferiores a los encontrados por otros autores (Ordiales *et al.*, 2013) y cumplen con la legislación europea.

No se determinaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en los parámetros masticabilidad, adhesividad o elasticidad. La dureza no mostró diferencias entre los 15 y los 45 días, pero aumentó de forma significativa a los 75 días. No se observaron diferencias significativas entre los 15 y los 75 días, para la gomosidad, alcanzando el valor máximo al final del periodo de maduración. El incremento en ambos parámetros pudo ser debido a una disminución de la cantidad de agua presente en el queso (Dimitreli y Thomareis, 2007). La cohesividad se mantuvo estable entre los 15 y los 45 días y disminuyó a los 75 de forma significativa ($P < 0.05$).

Por último, debido a la importancia de monitorizar las características sensoriales del queso, se analizaron parámetros relacionados con la textura, la apariencia, el olor y el sabor, así como la aceptación global del queso. Se observaron diferencias significativas en relación a todos los parámetros de textura estudiados. La dureza aumentó durante el periodo objeto de estudio pero no de una forma tan marcada como la dureza instrumental, mientras que la cremosidad y el carácter fundente se mantuvieron estables entre los 15 y los 45 días y disminuyeron a los 75 días.

También se observó una disminución de la adherencia durante todo el periodo de maduración. Para comprobar si existía relación entre los atributos de textura instrumental y sensorial se realizó un análisis de correlación de Pearson, y se determinó que la dureza determinada de forma sensorial no presentó correlación con el resto de parámetros sensoriales ni con los parámetros instrumentales. Por otro lado, la cremosidad, el carácter fundente y la adherencia presentaron relación inversa con la dureza instrumental, mientras que la cohesividad estuvo directamente relacionada con la gomosidad instrumental.

Los parámetros relacionados con la apariencia mostraron diferencias significativas entre los días de maduración estudiados. La uniformidad del color de la corteza aumentó de los 15 a los 45 días y disminuyó a los 75 días, alcanzando su valor mínimo, mientras que la uniformidad del color de la pasta, disminuyó a lo largo de todo el proceso. El número de ojos en el queso, disminuyó de los 15 a los 45 días y aumentó a los 75 días, aunque sin alcanzar el valor obtenido a los 15 días, posiblemente debido a la heterogeneidad de los quesos producida por la falta de prensado. En lo que respecta a los parámetros de olor, el olor a ácido no mostró diferencias significativas con valores muy bajos. La intensidad de olor se mantuvo estable hasta los 45 días, y disminuyó a los 75, mientras que el olor a leche de cabra, disminuyó a una puntuación cercana a 0 a los 45 días y se mantuvo así hasta los 75 días. Los valores de sabor no mostraron diferencias para los parámetros de salado, amargo o sabor a leche de cabra. Es importante señalar, que a pesar de que el queso fue elaborado con un coagulante vegetal, el sabor amargo obtuvo puntuaciones bajas (alrededor de 1) durante todo el estudio. La intensidad de sabor disminuyó entre los 45 y los 75 días y el sabor ácido solo se detectó a los

15 días, siendo despreciable a los 45 y 75 días. El incremento en la intensidad de sabor y olor entre los 15 y los 45 días y su posterior disminución a los 75 días puede estar relacionado con las variaciones en las fracciones PTASN, que como indicaron Tzanetakis *et al.* (1995) son compuestos que actúan como precursores de otros compuestos relacionados con el olor y el sabor.

La valoración global del queso no mostró diferencias entre los 15 y los 45 días, pero disminuyó a los 75 días, obteniendo el valor más bajo. Para comprender la relación que existe entre todos los parámetros sensoriales y la valoración global, se realizó una correlación de Pearson, en la que se obtuvieron diferencias significativas a lo largo de la maduración. Se observó que los parámetros de textura (cremosidad, capacidad fundente y adherencia) fueron los que más influían en este parámetro con una correlación directa. Cabe señalar que las puntuaciones globales fueron elevadas en su escala y superiores a las encontradas por Galán *et al.* (2008), quienes compararon quesos elaborados con cuajo animal y coagulante vegetal.

Estos resultados sugieren que el uso del coagulante de alcachofa y el cultivo iniciador comercial utilizado puede constituir una alternativa para la obtención de nuevas variedades de quesos de leche de cabra pasteurizada. Sin embargo, sería necesaria la realización de un estudio de consumidores que verificase el grado de aceptabilidad del mismo.

VII. CONCLUSIONES

PRIMERA. El uso de diferentes coagulantes da lugar a la obtención de diferencias en el proceso de coagulación de la leche de cabra, con tiempos de coagulación similares para el cuajo animal y los coagulantes vegetales, indicando una mejor adaptabilidad tecnológica de los coagulantes vegetales para la elaboración de quesos de cabra que el coagulante microbiano.

SEGUNDA. La utilización de diferentes coagulantes no influye en los parámetros fisicoquímicos ni en los parámetros de color instrumental, no obstante, se obtienen quesos más duros, amargos y con una menor valoración global en quesos frescos elaborados con coagulantes vegetales.

TERCERA. La utilización de diferentes cultivos iniciadores en la elaboración de quesos de leche de cabra modifica los parámetros de humedad, contenido proteico, pH, fracción de nitrógeno soluble en agua (WSN), fracción de nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico (PTASN) y dureza de los quesos.

CUARTA. El empleo de fermentos mesófilos asegura una correcta acidificación de los quesos, mientras que la incorporación de fermentos termófilos da lugar a la obtención de quesos con menor dureza, observándose en ambos casos una elevada tasa de proteólisis.

QUINTA. Se determina una mayor actividad coagulante en el extracto coagulante derivado de la flor de cardo (*Cynara cardunculus* L.) en relación al obtenido a partir del extracto de la flor de alcachofa (*Cynara scolymus* L.).

SEXTA. La cinética del proceso de coagulación de ambos coagulantes vegetales del género *Cynara* en relación a la concentración de enzima y temperatura de

coagulación es similar en ambos casos. La actividad coagulante de ambos extractos aumenta durante el almacenamiento en congelación.

SÉPTIMA. Los extractos acuosos de cardo y alcachofa no muestran diferencias significativas en los parámetros ópticos de coagulación derivados del sensor CoAguLabTM durante la coagulación de leche de cabra.

OCTAVA. Los parámetros fisicoquímicos del queso elaborado con extracto acuoso de alcachofa (*Cynara scolymus* L.) evolucionan de forma similar a otros quesos y la carga microbiológica no supera a la establecida por la legislación europea.

NOVENA. En la valoración global del queso elaborado con extractos de alcachofa (*Cynara scolymus* L.) los parámetros sensoriales que más condicionan la valoración de este atributo son la cremosidad, el carácter fundente y la adherencia, todos ellos relacionados con la textura del queso e influenciados por la proteólisis del coagulante vegetal.

DECIMA. El empleo del coagulante de alcachofa (*Cynara scolymus* L.) y el fermento *Iota Vacherin* en la elaboración de queso de leche de cabra pasteurizada constituyen una alternativa para la obtención de nuevas variedades de queso de leche de cabra pasteurizada.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Adhikari K, Heymann H y Huff H E (2003) Textural characteristics of lowfat, fullfat and smoked cheeses: sensory and instrumental approaches. *Food Quality and Preference* **14** 211–218.

AFNOR (1993) *Food Microbiology – Enumeration of Escherichia coli β -Glucuronidase Positive by Colony Count at 44 °C* (en francés). NF V 08-053. Paris: Association Française de Normalisation.

AFNOR (2004) *Food Microbiology – Routine Method for the Enumeration of Coagulase-Positive Staphylococci by Colony Count at 37 °C – Part 1: Technical with Colonies Confirmation* (en francés). NF V 08-057-1. Paris: Association Française de Normalisation.

AFNOR (2009) *Food Microbiology – Enumeration of Presumptive Coliforms by Colony Count at 30 °C* (en francés). NF V 08-050. Paris: Association Française de Normalisation.

Ardö Y (1999) Evaluating proteolysis by analysing the N content of cheese fractions. *Bulletin of International Dairy Federation* **337** 4–9.

Aruoma O, Spencer J P, Rossi R, Aeschbach R, Kahn A, Mahmood N, Munoz A, Murcia M A, Butler J y Halliwell B (1996) An evaluation of the antioxidant antiviral action of extracts of Rosemary and provençal herbs. *Food Chemistry and Toxicology* **34** 449–456.

Baudry C, De Cremoux R y Gaspard C E (1999) *Influence de la numération cellulaire sur la production et la composition du lait de chèvre*. Journées

Nationales GTV-INRA, Nantes, May 26–28. Vol. Antibiotherapie et antibioresistance, pp. 519–522 (en francés).

Benedito J, Gonzalez R, Rosselló C y Mulet A (2000) Instrumental and expert assessment of Mahon cheese texture. *Journal of Food Science* **65** 1170–1174.

Bergamini C V, Hynes E R y Zalazar C A (2006) Influence of probiotic bacteria on the proteolysis profile of semi-hard cheese. *International Dairy Journal* **16** 856–866.

Bertolino M, Dolci P, Giordano M, Rolle L y Zeppa G (2011) Evolution of chemico-physical characteristics during manufacture and ripening of Castelmagno PDO cheese in wintertime. *Food Chemistry* **129** 1001–1011.

Bertozzi L y Panari G (1993) Cheeses with Appellation d’Origine Controlée (AOC). Factors that affect quality. *International Dairy Journal* **3** 297–312.

Boletín Oficial del Estado (2013) *Texto consolidado (29 de marzo de 2013) de la Orden de 14 de enero de 1988 por la que se aprueba la norma general de identidad y pureza para el cuajo y otras enzimas coagulantes de leche destinados al mercado interior*. Núm. 17, de 20 de enero de 1988. BOE, España.

Bontinis T G, Mallatou H, Alichanidis E, Kakouri A y Samelis J (2008) Physicochemical, microbiological and sensory changes during ripening and storage of Xinotyri, a traditional Greek cheese from raw goat’s milk. *International Journal of Dairy Technology* **61** 229–236.

Bourne M C (1978) Texture profile analysis. *Food Technology* **41** 163–178.

Boutoial K, Rovira S, García V, Ferrandini E y López M B (2012) *Influence of feeding goats with thyme and rosemary extracts on the physicochemical and sensory quality of cheese and pasteurized milk*. In: Goats: Habitat, Breeding Management. Nova Science Publisher, NewYork, USA, pp. 45–54.

Boutoial K, Ferrandini E, Rovira S, García V y López M B (2013) Effect of feeding goats with Rosemary (*Rosmarinus officinalis* spp.) by production milk and cheese properties. *Small Ruminant Research* **112** 147–153.

Boyazoglu J, Hatziminaoglou, I y Morand-Fehr, P (2005) The role of the goat in society: Past, present and perspectives for the future. *Small Ruminant Research* **60** 13-23.

Buffa M, Trujillo A J, Pavia M y Guamis B (2001) Changes in textural, microstructural, and colour characteristics during ripening of cheeses made from raw, pasteurized or high-pressure-treated goats' milk. *International Dairy Journal* **11** 927–934.

Bütikofer U, Rüegg M y Ardö Y (1993) Determination of nitrogen fractions in cheese: evaluation of a collaborative study (1968–2004). *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie* **26** 271–275.

Calvo M V, Castillo I, Díaz-Barcos V, Requena T y Fontecha J (2007) Effect of a hygienized rennet paste and a defined strain starter on proteolysis, texture and sensory properties of semi-hard goat cheese. *Food Chemistry* **102** 917–924.

Caravaca F, Carrizosa J, Urrutia B, Baena F, Jordana J, Amills M, Badaoui B, Sánchez A, Angiolillo A y Serradilla J M (2009) Short communication: effect of α_{s1} -casein (CSN1S1) and κ -casein (CSN3) genotypes on milk composition in Murciano-Granadina goats. *Journal of Dairy Science* **92** 2960–2964.

Castillo, M (2001) Predicción del tiempo de corte en la elaboración de queso mediante dispersión de radiación de infrarrojo próximo. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia, Murcia.

Castillo M, Lucey J A, Wang T y Payne F A (2006) Effect of temperature and inoculum concentration on prediction of both gelation time and cutting time. Cottage cheese gels. *International Dairy Journal* **16** 147–152.

Castillo M, Payne F A, González R, López M B y Laencina J (2003) Clotting time determination by NIR. *Anales de Veterinaria de la Universidad de Murcia* **19** 23–36.

Castillo M, Payne F A, Hicks C L, Laencina J y López M B (2002) Effect of calcium and enzyme in cutting time prediction of coagulating goats' milk using a light scattering sensor. *International Dairy Journal* **12** 1019–1023.

Castillo M, Payne F A, Hicks C L y López, M B (2000) Predicting cutting and clotting time coagulating goat's milk using diffuse reflectance: effect of pH, temperature and enzyme concentration. *International Dairy Journal* **10** 551–562.

Cavalcanti, M T H, Teixeira, M F S, Lima Filho, J L y Porto A L F (2004) Partial purification of new milk-clotting enzyme produced by *Nocardioopsis* sp. *Bioresource Technology* **93** 29–35.

Chazarra S, Sidrach L, López-Molina D y Rodríguez-López J N (2007) Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus* L.) flowers. *International Dairy Journal* **17** 1393–1400.

Chianese L, Mauriello R, Moio L, Intorcchia N y Addeo F (1992) Determination of ovine casein heterogeneity using gel electrophoresis and immunochemical techniques. *Journal of Dairy Research* **59** 39–47.

Chiofalo V, Liotta L, Fiumanò R, Riolo E B y Chiofalo B (2012) Influence of dietary supplementation of *Rosmarinus officinalis* L. on performances of dairy ewes organically managed. *Small Ruminant Research* **104** 122–128.

Clément P, Agboola S y Bencini R (2006) A study of polymorphism in milk proteins from local and imported dairy sheep in Australia by capillary electrophoresis. *Food Science and Technology* **39** 63–69.

Comunian R, Paba A, Dupré I, Daga E S y Scintu M F (2010) Evaluation of a microbiological indicator test for antibiotic detection in ewe and goat milk. *Journal of Dairy Science* **93** 5644–5650.

Cordeiro M, Jakob E, Puhan Z, Pais M S y Brodelius (1992) Milk clotting and proteolysis activities of purified cynarases from *Cynara cardunculus* – a comparison to chymosin. *Milchwissenschaft* **47** 683-687.

Dalgleish, D G (1983) Coagulation of renneted bovine casein micelles: dependence on temperature, calcium ion concentration and ionic strength. *Journal of Dairy Research* **50** 331-340.

De Feo V, Quaranta E, Fedele V, Claps S, Rubino R y Pizza C (2006) Vegetal secondary metabolites in goat milk in relation to plant intake. *Italian Journal of Food Science* **18** 1–8.

Dejmek P y Walstra P (2004) *The syneresis of rennet-coagulated curd*. In: Fox, P.F. (Ed.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol. 1:General Aspects, 3rd ed. Chapman and Hall, London, UK, pp. 71–101.

Delgado F J, González-Crespo J, Cava R y Ramírez R (2011) Changes in the volatile profile of a raw goat milk cheese treated by hydrostatic high pressure at different stages of maturation. *International Dairy Journal* **21** 135–141.

Delgado F J, Rodríguez-Pinilla J, González-Crespo J, Ramírez R y Roa I (2010) Proteolysis and texture changes of a Spanish soft cheese ('Torta del Casar') manufactured with raw ewe milk and vegetable rennet during ripening. *International Journal of Food Science and Technology* **45** 512–519.

Dimitreli G y Thomareis A S (2007) Texture evaluation of block-type processed cheese as a function of chemical composition and in relation to its apparent viscosity. *Journal of Food Engineering* **79** 1364–1373.

Duarte P, Figueiredo R, Pereira S y I Pissarra J (2006) Structural characterization of the stigma-style complex of *Cynara cardunculus* (Asteraceae) and immunolocalization of cardosins A and B during floral development. *Canadian Journal of Botany* **84** 737-749

Dybowska E y Fujio Y (1996) Effect of temperature and glucono- δ -lactone GDL concentration on milk aggregation and gelation process as revealed by optical method. *Milchwissenschaft* **51** 557–560.

EU (2007) Commission Regulation (EC) N° 1441/2007 of 5 December 2007 amending Regulation (EC) N° 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union* (7.12.2007).

Evert-Arriagada K, Hernández-Herrero M M, Juan B, Guamis B y Trujillo A J (2012) Effect of high pressure on fresh cheese shelf-life. *Journal of Food Engineering* **110** 248–253.

Fagan C C, Castillo M, Payne F A, O'Donnell C P, Leedy M y O'Callaghan D J (2007a) Novel online sensor technology for continuous monitoring of milk coagulation and whey separation in cheesemaking. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **55** 8836–8844.

Fagan C C, Leedy M, Castillo M, Payne F A, O'Donnell C P y O'Callaghan D J (2007b) Development of a light scatter sensor technology for on-line monitoring of milk coagulation and whey separation. *Journal of Food Engineering* **83** 61–67.

Fagan C C, Castillo M, O'Donnell C P, O'Callaghan D J y Payne F A (2008) On-line prediction of cheese making indices using backscatter of near infrared light. *International Dairy Journal* **18** 120–128.

FAOSTAT (2015) Food and Agriculture Organization of the United Nations. Información en red disponible en: <http://faostat3.fao.org/home/E>

Farrell Jr. H M, Malin E L, Brown E M y Qi P X (2006) Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology? *Current Opinion in Colloid and Interface Science* **11** 135-147.

Faye B y Konuspayeva G (2012) The sustainability challenge to the dairy sector – The growing importance of non-cattle milk production worldwide. *International Dairy Journal* **24** 50-56.

Feligini M, Frati S, Vlatka C, Brambilla A, Parma P, Curik I, Greppi G y Enne G (2005) Caprine α s1-casein polymorphism: characterization of A, B, E and F variants by means of various biochemical and molecular techniques. *Food Technology and Biotechnology* **43** 123–132.

Fernández-Salguero J y Sanjuán E (1999) Influence of vegetable and animal rennet on proteolysis during ripening in ewes' milk cheese. *Food Chemistry* **64** 177–183.

Fernández-Salguero J, Tejada L y 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** 464–468.

Ferrandini E (2006) Elaboración de Queso de Murcia al Vino con cuajo natural en pasta. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia, Murcia.

Ferrandini E, Castillo M, López M B y Laencina J (2006) Modelos estructurales de la micela de caseína. *Anales de Veterinaria de la Universidad de Murcia* **22** 5-18.

Ferrandini E, López M B, Castillo M y Laencina J (2011) Influence of an artisanal lamb rennet paste on proteolysis and textural properties of Murcia al Vino cheese. *Food Chemistry* **124** 583–588.

Frazão C, Bento I, Costa J, Soares C M, Veríssimo P, Faro C, Pires E, Cooper J y Carrondo M A (1999) Crystal structure of cardosin A, a glycosylated and Arg-Gly-Asp-containing aspartic proteinase from the flowers of *C. cardunculus* L. *The Journal of Biological Chemistry* **274** 27694–27701.

Freitas C y Malcata F X (2000) Microbiology and biochemistry of cheeses with appellation d'origine protégée and manufactured in the Iberian Peninsula from ovine and caprine milks. *Journal of Dairy Science* **83** 584–602.

Gaborit P, Menard A y Morgan F (2001) Impact of ripening strains on the typical flavour of goat cheeses. *International Dairy Journal* **11** 315–325.

Galán E, Prados F, Pino A, Tejada L y 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** 93–98.

García V, Rovira S, Teruel R, Boutoia K, Rodríguez J, Roa I y López M B (2012) Effect of vegetable coagulant, microbial coagulant and calf rennet on physicochemical, proteolysis, sensory and texture profiles of fresh goats cheese. *Dairy Science and Technology* **92** 691–707.

García V, Rovira S, Boutoia K, Ferrandini E y 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** 552–559.

García V, Rovira S, Boutoial K, Álvarez D y López M B (2015) A comparison of the use of thistle (*Cynara cardunculus* L.) and artichoke (*Cynara scolymus* L.) aqueous extracts for milk coagulation. *Dairy Science and Technology* **95** 197–208.

García-Iñiguez de Ciriano M, García-Herreros C, Larequi E, Valencia I, Ansorena D y Astiasarán I (2009) Use of natural antioxidant from lyophilized water extracts of *Borago officinalis* in dry fermented sausages enriched in ω -3 PUFA. *Meat Science* **83** 271–277.

González-Martín I, González-Pérez C, Hernández-Hierro J y González-Cabrera J M (2008). Use of NIRS technology with a remote reflectance fibre-optic probe for predicting major components in cheese. *Talanta* **75** 351–355.

Guo M R, Wang S, Li Z, Qu J, Jin L y Kindstedt P S (1998) Ethanol stability of goat's milk. *International Dairy Journal* **8** 57–60.

Haenlein, G F W (2004) Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research* **51** 155-163.

Hassan A N y Frank J F (2001) *Starter cultures and their use*. In: E H Marth and J L Steele (eds). *Applied Dairy Microbiology*, 2nd edition. Marcel Dekker, Inc, New York.

Hayaloglu A A y Karagul-Yuceer Y (2011) Utilization and characterization of small ruminants' milk and milk products in Turkey: current status and new perspectives. *Small Ruminant Research* **101** 73–83.

Hashim M M, Mingsheng D, Iqbal M F y Xiaohong C (2011) Ginger rhizome as a potential source of milk coagulating cysteine protease. *Phytochemistry* **72** 458–464.

Heimgartner U, Pietrzak M, Geersten R, Brodelius P, da Silva Figueiredo A C i Pais M S S (1990) Purification and partial characterization of milk clotting proteases from flowers of *Cynara cardunculus*. *Phytochemistry* **29** 1405-1410.

Hynes E, Ogier J C y Delacroix-Buchet A (2001) Proteolysis during ripening of miniature washed-curd cheeses manufactured with different strains of starter bacteria and *Lactobacillus plantarum* adjunct culture. *International Dairy Journal* **11** 587–597.

Hyslop D B, Richardson T y Ryans D S (1979) Kinetics of pepsin-initiated coagulation of κ -casein. *Biochimica et Biophysica Acta* **556** 390–396.

IDF (1964) *Determination of the protein content of processed cheese products*. FIL-IDF standard 25. Bruselas: International Dairy Federation.

IDF (1982) *Cheese and processed cheese. Determination of the total solids content*. FIL-IDF standard 4A. Bruselas: International Dairy Federation.

IDF (1997) *Bovine rennets. Determination of total milk-clotting activity*. FIL-IDF standard 157A. Bruselas: International Dairy Federation.

IDF (2004) *Cheese and Processed Cheese. Determination of the Total Solids Content*. IDF standard 4. Bruselas: International Dairy Federation.

IDF (2007) *Milk. Determination of total milk-clotting activity of bovine rennets*. IDF standard 157. Bruselas: International Dairy Federation.

IDF/RM (2008) *Processed Cheese Products. Determination of Nitrogen Content and Crude Protein Calculation. Kjeldahl Method*. IDF Standard 25. Bruselas: International Dairy Federation

Inda, A (2000) Optimización de rendimiento y aseguramiento de inocuidad en la industria de quesería. Organización de los Estados Americanos (OEA) y la Agencia Alemana de Cooperación para el desarrollo (gtz).

ISO (1975) *Determination of fat content. Van Gulik method*. ISO standard 3433. Génova: International Organization for Standardization.

ISO (1996) *Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Detection and Enumeration of Listeria monocytogenes. Part 1: Detection Method*. ISO standard 11290. Génova: International Organization for Standardization.

ISO (2005) *Sensory Analysis. Methodology. General Guidance*. ISO Standard 6658. Génova: International Organization for Standardization.

ISO (2008) *Cheese Determination of Fat Content. Van Gulik Method*. ISO standard 3433. Génova: International Organization for Standardization.

Jacob M, Jaros D y Rohm H (2011) Recent advances in milk clotting activity. *International Journal of Dairy Technology* **64** 14–33.

Jandal J M (1996) Comparative aspects of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* **22** 177–185.

Jordán M J, Martínez R M, Martínez C, Moñino I, Sotomayor J A (2009) Polyphenolic extract and essential oil quality of *Thymus zygis* ssp. *gracilis* shrubs cultivated under different watering levels. *Industrial Crops and Products* **29** 145–153.

Jordán M J, Moñino M I, Martínez C, Lafuente A y Sotomayor J A (2010) Introduction of distillate rosemary leaves into the diet of the Murciano-Granadina goat: transfer of polyphenolic compounds to goats' milk and the plasma of suckling goat kids. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **58** 8265–8270.

Juan B, Trujillo A J, Guamis V, Buffa M y Ferragut V (2007) Rheological, textural and sensory characteristics of high-pressure treated semi-hard ewe's milk cheese. *International Dairy Journal* **17** 248–254.

Katsiari M C, Kondyli E y Voutsinas L P (2009) The quality of Galotry-type cheese made with different starter cultures. *Food Control* **20** 113–118.

Kopelman I J y Cogan U (1976) Determination of clotting power of milk clotting enzymes. *Journal of Dairy Science* **59** 196–199.

Kurt A y Cakmacki S (1991) Some applications of increasing cheese yield. *Food Industry* **5** 49–52.

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

Larsen M D, Kristiansenb K R y Hansen T K (1998) Characterization of the proteolytic activity of starter cultures of *Penicillium roqueforti* for production of blue veined cheeses. *International Journal of Food Microbiology* **43** 215–221.

Laso N, Brugué E, Vidal J, Ros E, Arnaiz J A, Carné X, Vidal S, Mas S, Deulofeu R y Lafuente A (2007) Effects of milk supplementation with conjugated linoleic acid (isomers cis-9, trans-11 and trans-10,cis-12) on body composition and metabolic syndrome components. *British Journal of Nutrition* **98** 860–867.

Law, B A (1999) *Technology in cheesemaking*. F V Kosikowski and Associates, Brooktondale, Nueva York.

Lawrence R C, Creamer L K y Gilles J (1987) Texture development during cheese ripening. *Journal of Dairy Science* **70** 1748–1760.

León J M, Macciotta N P P, Gama L T, Barba C y Delgado J V (2012) Characterization of the lactation curve in Murciano-Granadina dairy goats. *Small Ruminant Research* **107** 76–84.

Leroy F y De Vuyst L (2004) Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology* **15** 67-78.

Li D, Bode O, Drummond H y Sinclair A J (2003) *Omega-3 (n-3) fatty acids*. In: Gunstone, F.D. (Ed.), *Lipids for Functional Foods Nutraceuticals*. The Oily Press, UK, pp. 225–262.

Llorente B E, Brutti C B y Caffini N O (2004) Purification and characterization of a milk-clotting aspartic proteinases from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **52** 8182–8189.

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

Lo Piero A R, Puglisi I y Petrone G (2002) Characterization of “Lettucine”, a serine-like protease from *Lactuca sativa* leaves, as a novel enzyme for milk clotting. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **50** 2439–2443.

Loor J J, Herbein J H y Polan C E (2002) Trans18:1 and 18:2 isomers in blood plasma and milk fat of grazing cows fed a grain supplement containing solvent-extracted or mechanically extracted soybean meal. *Journal of Dairy Science* **85** 1197–1207.

López M B, Jordán M J, Luna A, Bañón S, Garrido M D y Laencina J (1997) Diffuse reflectance profiles of goat’s milk during coagulation by various enzymes. *Food Science and Technology International* **3** 299-301.

Lucey J A (2002) *Rennet coagulation of milk*. In: Roginski H, Fuquay J W y Fox PF (ed.) *Enciclopedia of Dairy Sciences* Vol. 1. Pp. 286-293.

Lucey J A y Fox P F (1993) Importance of calcium and phosphate in cheese manufacture: A review. *Journal of Dairy Science* **76** 1714-1724.

Macedo A C y Malcata F X (1997) Hydrolysis of α_s - and β -caseins during ripening of Serra Cheese. *Food Chemistry* **58** 43–48.

Macfie H J, Bratchell N, Greehoff K y Vallis L V (1989) Designs to balance the effect of order of presentation and first order carry over effect in hall tests. *Journal of Sensory Studies* **4** 129–148.

Martínez A L (2011) Adición de aceites vegetales de diferente grado de insaturación a la ración de cabras lecheras. Efectos sobre la utilización de la ración y la producción y composición de la leche. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.

Martínez S, Franco I y Carballo J (2011) Spanish goat and sheep milk cheeses. *Small Ruminant Research* **101** 41-54.

Mendia C, Ibañez F J, Torre P y Barcina Y (2000) Effect of pasteurization and use of a native starter culture on proteolysis in a ewe's milk cheese. *Food Control* **11** 195–200.

Mendiola, F J (2000) Obtención y caracterización del coagulante de leche normalizado de origen vegetal (*Cynara cardunculus*) y su aplicación en la elaboración de quesos de La Serena. Tesis Doctoral, Universidad de Extremadura, Extremadura.

Michaelidou A, Katsiari M C, Voutsinas L P, Kondyli E y Alichanidis E (2003) Effect of commercial adjuncts cultures on proteolysis in low-fat Kefalograviera-type cheese. *International Dairy Journal* **13** 743–753.

Milani F X y Wendorff W L (2011) Goat and sheep milk products in the United States (USA). *Small Ruminant Research* **101** 134–139.

Milos M y Makota D (2012) Investigation of antioxidant synergisms and antagonisms among thymol, carvacrol, thymoquinone and p-cymenein a model system using the Briggs–Rauscher oscillating reaction. *Food Chemistry* **131** 296–299.

Minervini F, Bilancia M T, Siragusa S, Gobbetti M y Caponio F (2009) Fermented goats' milk produced with selected multiple starters as a potentially functional food. *Food Microbiology* **26** 559–564.

Morand-Fehr P, Fedele V, Decandia M y Le Frileux Y (2007) Influence of farming and feeding systems on composition and quality of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* **68** 20–34.

Nieto G, Díaz P, Bañon S, Garrido M D (2010) Dietary administration of ewe diets with a distillate from rosemary leaves (*Rosmarinus officinalis* L.): influence on lamb meat quality. *Meat Science* **84** 23–29.

Nudda A, Battacone G, Decandia M, Acciaro M, Aghini-Lombardi F, Frigeri M y Pulina G (2009) The effect of dietary iodine supplementation in dairy goats on milk production traits and milk iodine content. *Journal of Dairy Science* **92** 5133–5138.

Ordiales E. (2012) caracterización del cardo (*Cynara cardunculus* L.) para su uso como cuajo vegetal en el proceso de elaboración de la torta del casar. Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura, Badajoz.

Ordiales E, Martín A, Benito M J, Hernández A, Ruiz-Moyano S y Córdoba M de G (2013) Role of the microbial population on the flavour of the soft-bodied cheese Torta del Casar. *Journal of Dairy Science* **96** 5477–5486.

Ordiales E, Martín A, Benito M J, Fernández M, Casquete R y Córdoba M de G (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** 402–409.

Ortigosa M, Bárcenas P, Arizcun C, Pérez-Elortondo F, Albisu M y Torre P (1999) Influence of the starter culture on the microbiological and sensory characteristics of ewe’s cheese. *Food Microbiology* **16** 237–247.

Osborne B G y Fearn T (1986) *Theory of near infrared spectrophotometry. Near infrared spectroscopy in food analysis*. England: Longman Scienti & Technical, Longman Group UK Limited.

Pandya A J y Ghodke K M (2007) Goat and sheep milk products other than cheeses and yoghurt. *Small Ruminant Research* **68** 193–206.

Pappa E C, Kandarakis I, Anifantakis E M y Zerfiridis G K (2006) Influence of types of milk and culture on the manufacturing practices, composition and sensory characteristics of Teleme cheese during ripening. *Food Control* **17** 570–581.

Pappa E C, Kandarakis I y Mallatou H (2007) Effect of different types of milk and culture on the rheological characteristics of Teleme cheese. *Journal of Food Engineering* **79** 143–149.

Pappa E C y Sotirakoglou K (2008) Changes of free amino acid content of Teleme cheese made with different types of milk and culture. *Food Chemistry* **111** 606–615.

Parejo I Viladomat F, Bastida J, Rosas-Romero A, Flerlage N, Burillo J y Codina C (2002) Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and non distilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **50** 6882–6890.

Park Y W (2001) Proteolysis and lipolysis of goat milk cheese. *Journal of Dairy Science* **84 (E. Suppl.)** E84–E92.

Park Y W y Guo M R (2006a). *Goat milk products: processing technology, types and consumption trends*. In: Park Y W y Haenlein G F W (Eds.), *Handbook of Milk of Non-bovine Mammals*. Blackwell Publishers, Ames, Iowa/Oxford, England, p. 59-106.

Park Y W y Guo M R (2006b) *Therapeutic and hypo-allergenic values of goat milk and implication of food allergy*. In: Park Y W y Haenlein G F W (Eds.), *Handbook of Milk of Non-bovine Mammals*. Blackwell Publishers, Ames, Iowa/Oxford, England, p. 121-136.

Park Y W, Juárez M, Ramos M y Haenlein G F W (2007) Physicochemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Rumin. Research* **68** 88–113.

Payens T A J, Wiersma A K y Brinkhuis J (1977) On enzymatic clotting processes. I. Kinetics of enzyme triggered coagulation reactions. *Biophysical Chemistry* **6** 253–262.

Payne F A y Hicks C L (1992) Method for predicting cut-time of milk coagulum in cheese-making process. US Patent N° 5172, 193.

Payne F A, Hicks C L, Madangopal S y Shearer S A (1993a) Fibre optic sensor for predicting the cutting time of coagulation milk for cheese production. *Transactions of the ASAE* **36** 841–847.

Payne F A, Hicks C L y Shen P S (1993b) Predicting optimal cutting time of coagulating milk using diffuse reflectance. *Journal of Dairy Science* **76** 48-61.

Payne F A, Gates R S y Fannin B L (1996) Measurement precision for a fiber optic diffuse reflectance sensor. *Transactions of the ASAE* **39** 2163-2198.

Pereira CI, Gomes E O, Gomes A M P y Malcata F X (2008) Proteolysis in model Portuguese cheeses: effect of rennet and starter culture. *Food Chemistry* **108** 862–868.

Pimentel C, Van Der Straeten D, Pires E, Faro C y Rodrigues-Pousada C (2007) Characterization and expression analysis of the aspartic protease gene family of *Cynara cardunculus* L. *FEBS Journal* **274** 2523–2539.

Pino A, Prados F, Galán E, McSweeney P L H y Fernández-Salguero J (2009) Proteolysis during the ripening of goats' milk cheese made with plant coagulant or calf rennet. *Food Research International* **42** 324–330.

Pinto M S, Fernandes de Carvalho A, dos Santos Pires A C, Campos Souza A A, Fonseca da Silva P H, Sobral D, Jacinto de Paula J C y de Lima Santos A (2011) The effects of nisin on *Staphylococcus aureus* count and the physicochemical

properties of Traditional Minas Serro cheese. *International Dairy Journal* **21** 90–96.

Pirisi A, Pinna G, Addis M, Piredda G, Muriello R, De Pascale S, Caira S, Mamone G, Ferranti P, Addeo F y Chianese L (2007) Relationship between the enzymatic composition of lamb rennet paste and proteolytic, lipolytic pattern and texture of PDO Fiore Sardo ovine cheese. *International Dairy Journal* **17** 143–156.

Pizzillo M, Cogliandro E, Rubino R y Fedele V (1996) *Relationship between somatic cells and milk quality in different goat production systems*. In: Rubino R (Ed.), *Proceedings of the Somatic Cells and Milk of Small Ruminants*. Bella, Italy, September 25–27, 1994. EAAP Publication N° 77, Wageningen Pers, pp. 269–273.

Poveda J M, Sousa M J, Cabezas L y McSweeney P L H (2003) Preliminary observations on proteolysis in Manchego cheese made with a defined-strain starter culture and adjunct starter (*Lactobacillus plantarum*) or a commercial starter. *International Dairy Journal* **13** 160–178.

Pulina G, Nudda A, Battacone G y Cannas A (2006) Effects of nutrition on the contents of fat, protein, somatic cells, aromatic compounds, and undesirable substances in sheep milk. *Animal Feed Science and Technology* **131** 255–291

Queiroz Macedo I, Faro C J y Pires E M (1996) Caseinolytic specificity of Cardosin, an aspartic protease from the cardoon *Cynara cardunculus* L.: action on bovine α_s - and β -casein and comparison with chymosin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **44** 42–47.

Raccuia S A, Mainolfi A, Mandolino G y Melilli M G (2004) Genetic diversity in *Cynara cardunculus* L. revealed by ALFP markers: comparison between cultivars and wild types of Sicily. *Plant Breed* **123** 280–284.

Raff M, Tholstrup T, Toubro S, Bruun J M, Lund P, Straarup E M, Christensen R, Sandberg M B y Mandrup S (2009) Conjugated linoleic acids reduce body fat in healthy postmenopausal women. *Journal of Nutrition* **139** 1347–1352.

Raynal-Ljutovac K, Gaborit P y Lauret A (2005) The relationship between quality criteria of goat milk, its technological properties and the quality of the final products. *Small Ruminant Research* **60** 167–177.

Raynal-Ljutovac K, Pirisi A, de Crémoux R y Gonzalo C (2007) Somatic cells of goat and sheep milk: analytical, sanitary, productive and technological aspects. *Small Ruminant Research* **68** 126–144.

Raynal-Ljutovac K, Lagriffoul G, Paccard P, Guillet I y Chilliard Y (2008) Composition of goat and sheep milk products: An Update. *Small Ruminant Research* **79** 57–72.

Remeuf F, Ricordeau G, Brignon G y Grosclaude F (2001) Influence de la teneur en caséine beta sur les caractéristiques physicochimique et l'aptitude à la coagulation enzymatique du lait de chèvre. *Lait* **81** 731–742 (en francés).

Ribeiro S D A y Ribeiro A C (2010) Specialty products made from goat milk. *Small Ruminant Research* **89** 225–233.

Roa I, López M B y Mendiola F J (1999) Residual clotting activity and ripening properties of vegetable rennet from *Cynara cardunculus* in La Serena cheese. *Food Research International* **32** 413–419.

Rodríguez-Alcalá L M, Harte F y Fontecha J (2009) Fatty acid profile and CLA isomers content of cow, ewe and goat milks processed by high pressure homogenization. *Innovative of Food Science Emerging Technologies* **10** 32–36.

Rodríguez-Otero J L, Hermida M y Cepeda A (1997) Analysis of dairy products by near-infrared spectroscopy: a review. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **45** 2815–2819.

Roseiro L B, Barbosa M, Ames J M y Wilbey R A (2003) Cheesemaking with vegetable coagulants—the use of *Cynara L.* for the production of ovine milk cheeses. *International Journal of Dairy Technology* **56** 76–85.

Rovira S, García V y López M B (2012a) Application of a large field-of-view sensor during coagulation and syneresis in fresh goat cheese manufacture. *International Journal of Dairy Technology* **65** 51–56.

Rovira S, García V, Ferrandini E, Carrión J, Castillo M y López M B (2012b). Usefulness of a Large Field of View sensor for physicochemical, textural and yield predictions under industrial goat cheese (Murcia alVino) manufacturing conditions. *Journal of Dairy Science* **95** 6320–6331.

Saldo J, Fernández A, Sendra E, Butz P, Tauscher B y Guamis B (2003) High pressure treatment decelerates the lipolysis in a caprine cheese. *Food Research International* **36** 1061–1068.

Sánchez-Macías D, Morales-de la Nuez A, Torres A, Hernández-Castellano L E, Jiménez-Flores R, Castro N y Argüello A (2013) Effects of addition of somatic cells to caprine milk on cheese quality. *International Dairy Journal* **29** 61–67.

Sanjuán E, Millán R, Saavedra P, Carmona M A, Gómez R y Fernández-Salguero J (2002) Influence of animal and vegetable rennet on the physicochemical characteristics of Los Pedroches cheese during ripening. *Food Chemistry* **78** 281–289.

Sanz Sampelayo M R, Chilliard Y, Schmidely P y Boza J (2007) Influence of type of diet on the fat constituents of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* **68** 42–63.

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 y Barros T M (2009) Multiplicity of aspartic proteinases from *Cynara cardunculus* L. *Planta* **230** 429–439.

Sbodio, O A y Revelli G R (2012) Coagulación de la Leche. Desarrollo de un dispositivo para el “monitoreo” *online* del proceso. Avances en la Argentina. *Revista Argentina de Lactología* **38** 236-246.

Serafeimidou A, Zlatanov S, Laskaridis K y Sagredos A (2012) Chemical characteristics, fatty acid composition and conjugated linoleic acid (CLA) content of traditional Greek yogurts. *Food Chemistry* **134** 1839–1846.

Settani L y Moschetti G (2010) Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology* **27** 691–697.

Shah M A, Mir S A y Paray M A (2014) Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. *Dairy Science and Technology* **94** 5-16.

Shingfield K J, Ahvenjärvi S, Toivonen V, Vanhatalo A, Huhtanen P y Griinari J M (2008) Effect of incremental levels of sunflower-seed oil in the diet on ruminal lipid metabolism in lactating cows. *British Journal of Nutrition* **99** 971–983.

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

Silanikove N, Leitner G, Merin, U y Prosser C G (2010) Recent advances in exploiting goat's milk: Quality, safety and production aspects. *Small Ruminant Research* **89** 110-124.

Silva S V y Malcata F X (2005) Studies pertaining to coagulant and proteolytic activities of plant proteases from *Cynara cardunculus*. *Food Chemistry* **89** 19–26.

Silva S V, Allmere T, Malcata F X y Andrén A (2003) Comparatives studies on the gelling properties of cardosins extracted from *Cynara cardunculus* and chymosin on cow's skim milk. *International Dairy Journal* **13** 559–564.

Simões I y Faro C (2004) Structure and function of plant aspartic proteinases. *European Journal of Biochemistry* **271** 2067-2075.

Simopoulos A P (2008) The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine* **233** 674–688.

Soler J (2015) La Gastronomía de José Soler (página web):
<http://www.gastrosoler.com>

Sousa M J, Ardö Y y McSweeney P L H (2001) Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal* **11** 327–345.

Tabayehnejad N, Castillo M y Payne F A (2012) Comparison of total milk clotting activity measurement precision using the Berridge clotting time method and a proposed optical method. *Journal of Food Engineering* **108** 549–556.

Tavaria F K, Franco I, Carballo F J y Malcata F X (2003) Amino acid and soluble nitrogen evolution throughout ripening of Serra da Estrela cheese. *International Dairy Journal* **13** 537–545.

Tejada L, Abellán A, Cayuela J M, Martínez-Cacha A y Fernández-Salguero J (2008) Proteolysis in goat's milk cheese made with calf rennet and plant coagulant. *International Dairy Journal* **18** 139–146.

Trujillo A J, Buffa M, Casals I, Fernández P y Guamis B (2002) Proteolysis in goat cheese made from raw, pasteurised or pressure-treated milk. *Innovative of Food Science Emerging Technologies* **3** 309–319.

Tzanetakis N, Vafopoulou-Mastrojiannaki A y Litopoulou-Tzanetaki E (1995) The quality of white-brined cheese from goat's milk made with different starters. *Food Microbiology* **12** 55–63.

Vacas C (2003) Evolución del sector caprino en la Región de Murcia (1986-2000) y su caracterización productiva al final del milenio. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.

Van Hekken D L, Tunick M H, Malin E L y Holsinger V H (2007) Rheology and melt characterization of low-fat and full fat Mozzarella cheese made from microfluidized milk. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie* **40** 89–98.

van Hooydonk A C M y Walstra P (1987) Interpretation of the kinetics of the renneting reaction in milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **41** 19–47.

Varnam A H y Sutherland J P (1994) *Leche y productos lácteos. Tecnología, química y microbiología. Alimentos básicos, serie 1*. Editorial Acribia, Zaragoza, España.

Veríssimo P, Esteves C, Faro C y Pires E (1995) The vegetable rennet of *Cynara cardunculus* L. contains two proteinases with chymosin and pepsin-like specificities. *Biotechnol Letters* **17** 621–626.

Wang S, Zhang H Y, Wang L, Duan Z J y Kennedy I (2006) Analysis of sulphonamide residues in edible animal products: a review. *Food Additives and Contaminants* **23** 362–384.

Walstra P, Noomen A y Geurts T J (1993) *Dutch-type varieties*. In: Fox P F (Ed.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol.2. Major Cheese Groups. 2nd ed. Chapman & Hall, London. pp. 39–82.

Welthagen J J y Viljoen B C (1998) Yeast profile in Gouda cheese during processing and ripening. *International Journal of Food Microbiology* **41** 185–194.

Wettasinghe M, Shahidi F, Amarowickz R y Abou-Zaid M M (2001) Phenolic acids in defatted seeds of borage (*Borago officinalis* L.). *Food Chemistry* **75** 49–56.

Xu J, Yin W, Zhang Y, Yi J, Meng M, Wang Y, Xue H, Zhang T y Xi R (2012) Establishment of magnetic beads-based enzyme immunoassay for detection of chloramphenicol in milk. *Food Chemistry* **134** 2526–2531.

Zare F, Boye J I, Orsat V, Champagne C y Simpson B K (2011) Microbial, physical and sensory properties of yogurt supplemented with lentil flour. *Food Research International* **44** 2482–2488.

Zerfiridis G K (2001) Soft cheeses, in *Technology of dairy products. I. Cheese-Making*. In: Zerfiridis G K (ed.). Giaxoudi-Giapouli, Thessaloniki, Greece, pp. 155–198.

Zervas G y Tsiplakou E (2011) The effect of feeding systems on the characteristics of products from small ruminants. *Small Ruminant Research* **101** 140–149.