

EMPLEO DE COAGULANTES VEGETALES EN LECHE DE CABRA MURCIANO-GRANADINA

Use of vegetable coagulants in Murciano-Granadina goat milk

García, V.*¹, Rovira, S.¹, Teruel, R.¹, Roa, I.², López, M.B.¹

¹Departamento Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia, Campus de Espinardo 30071 Murcia, España.

² Instituto Tecnológico Agroalimentario. Junta de Extremadura. Apto. 20107, Badajoz 06071, España.

***Autor para correspondencia:** Víctor García Alcaraz. Tel: +34-868883694 Fax: +34-868884147, Email: victor.garcial@um.es

RESUMEN

El uso de coagulantes alternativos en la fabricación del queso favorece la obtención de productos con diferentes características a los que habitualmente encontramos en el mercado. Los coagulantes vegetales más utilizados en la actualidad son los derivados de *Cynara Cardunculus*, ya que permiten la elaboración de variedades de quesos con características organolépticas diferentes, que son ampliamente aceptadas por consumidores. En este trabajo se ha comparado la actividad coagulante de dos extractos vegetales de la flor de cardo (cardo silvestre: *Cynara cardunculus* subsp. *flavescens* y cardo cultivado: *Cynara cardunculus* subsp. *cardunculus*) comparándolos con coagulantes de origen animal y microbiano en leche de cabra Murciano-Granadina. Para ello se han utilizado dos métodos que definen el tiempo de coagulación: determinación visual de la aparición de los primeros flóculos (Método de Berridge) y la aplicación de sensores ópticos (CoAguLab™). No se observan diferencias significativas en el perfil de reflectancia difusa, obtenido por el sensor CoAguLab™ entre los coagulantes vegetales y microbianos, pero si entre estos y los de origen animal con un 80% de quimosina. Los resultados obtenidos demuestran la existencia de una correlación lineal entre ambos métodos, por lo que el sensor óptico podría ser una alternativa al método de Berridge.

Palabras clave: *Cynara cardunculus*, coagulantes, CoAguLab™, sensor óptico, Método de Berridge, leche de cabra.

ABSTRACT

The uses of alternative coagulants in cheese manufacture increase the products variability usually found in the market. Most of the vegetable coagulants used today are derived from *Cynara cardunculus* which allow the

development of cheeses with different sensory characteristics. In this study, the clotting activity of two vegetable coagulants (wild cardoon: *Cynara cardunculus* subsp. *flavescens* and cultivated cardoon: *Cynara cardunculus* subsp. *cardunculus*) was compared with animal rennet and microbial coagulant in Murciano-Granadina goat milk. Two different procedures have been applied: Berridge method and optic sensor (CoAguLab™). The corresponding means of vegetable, animal and microbial coagulant reflectance profiles obtained by CoAguLab™ were compared and no differences were found between vegetal and microbial coagulants, while differences were found between these and animal rennet (80% chymosin). Monitoring results showed the existence of a linear relationship between both methods, so that the optical sensor could be an alternative for Berridge method.

Keywords: *Cynara cardunculus*, coagulants, CoAguLab™, optic sensor, Berridge Method, goat milk

INTRODUCCIÓN

Uno de los factores que condicionan las características finales del queso es el proceso de coagulación, siendo el tipo de enzima el factor más influyente (Esteves *et al.*, 2001). Aunque durante la elaboración de diferentes tipos de quesos las enzimas responsables del proceso de coagulación se utilizan en pequeñas cantidades, el origen de las mismas (animal, microbiano o vegetal) tiene una gran importancia en el producto final, ya que desempeñan un papel preponderante en sus características organolépticas, especialmente cuando los períodos de maduración de los quesos son prolongados, por lo que se debe asegurar que la adaptabilidad tecnológica del tipo coagulante con el que vamos a trabajar sea la adecuada.

Las variaciones existentes entre las características de las diversas variedades de quesos, se basan en la diferente degradación de la matriz proteica producida por los agentes empleados en el proceso de coagulación durante la maduración. Dicha degradación influye en los cambios del perfil de textura del queso (elasticidad, fragilidad, adhesividad, dureza, gomosidad y masticabilidad), en el desarrollo de sabores básicos (salado, amargo, dulce, ácido y umámico), y por supuesto en su olor, por la producción de amoníaco, aminas, compuestos azufrados y ácidos grasos libres volátiles (Macedo *et al.*, 1996).

Además de las enzimas de origen animal y microbiano, las plantas también producen proteasas que pueden coagular la leche y que se en-

cuentran en distintos lugares como frutos, semillas, raíz o savia, pero principalmente se localizan en las hojas y flores. Diferentes proteasas (papaína, fidina y bromelina) extraídas de las plantas superiores *Carica papaya*, *Ficus glabra* y *Ananas comosus*, respectivamente, han sido ensayadas como potenciales sustitutas del cuajo (Roseiro *et al.*, 2003), pero los resultados no han sido muy prometedores debido a su elevada actividad proteolítica así como por la capacidad de producir péptidos amargos (Koning-De, 1978). El coagulante vegetal más conocido es el derivado de la flor del cardo (*Cynara cardunculus*), con una mayor actividad proteolítica frente al cuajo de ternera que favorece la obtención de una pasta más blanda (Vieira de Sa y Barbosa, 1972). La utilización del coagulante de *Cynara cardunculus* como sustituto de cuajo animal es empleado en la fabricación de algunos quesos de leche de oveja, como el de la Serena, en Badajoz o la Torta del Casar, en Cáceres y en leche de cabra como el queso Los Íbores. La utilización de leche de oveja y de cabra está relacionada con el hecho de que en leche de vaca los quesos fabricados con coagulante vegetal tienen un excesivo carácter amargo (Sanjuán *et al.*, 2002). En cambio, los quesos fabricados con leche de cabra u oveja tienen un sabor más pronunciado y agradable, hecho que está relacionado con valores más elevados de nitrógeno soluble y un menor porcentaje de caseína residual. Las proteasas presentes en las flores de los cardos del género *Cynara* spp. con actividad coagulante pueden ser denominadas de diferentes formas: cynarasas (Heimgartner

et al., 1990), cyprosinas (Cordeiro *et al.*, 1992) o cardosinas (Pires *et al.*, 1994). Un aumento notable de la actividad coagulante de estas enzimas tiene lugar a mayor temperatura, excepto a pH ácido, donde el efecto de la temperatura no afecta al tiempo de coagulación, por lo que la enzima es más sensible a valores bajos de pH, en los que se produce un aumento de la actividad coagulante (Tejada *et al.*, 2005).

Para obtener el punto de gelificación de la leche durante la coagulación, se ha empleado la determinación del tiempo de coagulación, mediante el método de Berridge, que se basa en la observación visual de los primeros flóculos de caseína adheridos a la pared de vidrio de un tubo de ensayo (Berridge, 1952), y que ha dado lugar a la publicación de diversas normas de la Federación Internacional de Lechería (FIL-IDF) más específicas (como la IDF 157A:1997, la IDF 176:2002 o la IDF 199:2006) utilizadas para caracterizar nuevos coagulantes, como los coagulantes vegetales (Vioque y Gómez, 2005a y b). Además del proceso descrito por Berridge, existen otros procedimientos más objetivos para calcular el punto de gelificación de la leche basados en diferentes propiedades físicas como la viscosidad, la conductividad o la dispersión de la luz, entre otras (Castillo, 2003). Recientemente se han aplicado sensores que utilizan las propiedades de dispersión de la luz para la monitorización "on-line" durante el proceso de coagulación y sinéresis del queso (Payne *et al.*, 1993; Castillo *et al.*, 2002; Fagan *et al.*, 2007) y que pueden ser utilizados como métodos objetivos tanto para el control del tiempo de coagulación y de corte a nivel industrial como para la caracterización de nuevos coagulantes.

El objetivo principal de este trabajo de investigación es estudiar el proceso de coagulación de los coagulantes vegetales en leche de cabra Murciano-Granadina, comparándolos con el coagulante microbiano *Mucor miehei* y el cuajo de ternera. Para ello se ha determinado la actividad coagulante en base a dos métodos: el método de Berridge y el sensor óptico CoAgu-

LabTM. La evolución del proceso de coagulación en leche de cabra Murciano-Granadina se estudia a través de parámetros ópticos determinados mediante el sensor de reflectancia difusa.

MATERIAL Y MÉTODOS

Leche de cabra Murciano-Granadina

La leche de cabra Murciano-Granadina se obtuvo de la granja de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia. Tras el ordeño, la leche se mantuvo en refrigeración a 4 °C hasta su posterior transporte refrigerado a la planta piloto de Tecnología de Alimentos de la Universidad de Murcia.

Cuajos y enzimas coagulantes

Las muestras pertenecientes a la especie silvestre del cardo (*Cynara cardunculus* subsp. *flavescens*) y a una variedad del cardo cultivado, seleccionado en la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos (ETSIA) de Madrid, (*Cynara cardunculus* subsp. *cardunculus*) fueron proporcionadas por el Instituto Tecnológico Agroalimentario de la Junta de Extremadura.

La extracción de la enzima coagulante de ambas variedades se realizó mediante una suspensión de 10 g de flores, previamente molidas, en 90 ml de agua destilada, durante 30 minutos. El extracto resultante se filtró a través de un paño de quesería y posteriormente se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se filtró a través de papel de filtro (WhatmanTM 540) y se mantuvo en refrigeración a 4 °C hasta su utilización (Mendiola, 2000).

La enzima coagulante microbiana utilizada (RENIPLUS NG 50L, Caglio Star España S.A., Murcia, <http://www.proquiqa.es>) es una enzima termolábil obtenida por fermentación de *Mucor miehei*, en una solución a base de compuestos nitrogenados de bajo peso molecular de origen animal. La preparación comercial tiene una ac-

tividad coagulante de 750 IMCU/mL (International Milk Coagulating Units).

El cuajo líquido utilizado (ASKM, Caglio Star España S.A., Cieza, Murcia, España) está compuesto por una mezcla de quimosina y pepsina obtenida de rumiantes en una proporción del 80% quimosina y 20% pepsina, con un título coagulante 1:15.000.

Determinación del tiempo de coagulación de Berridge

Se empleó el método de Berridge descrito en la norma IDF 157A (1997) utilizando como sustrato leche estándar (Milk powder for rennet testing/25Kg. Lote: S1-02-552. CHR Hansen, Denmark). El cálculo de la actividad coagulante, expresada en IMCU, se determinó en base a estándares de referencia (98% pepsina y 98% quimosina, CHR Hansen, Denmark), tal como se detalla en la norma IDF 157A:1997. Los enzimas coagulantes vegetales se añaden a una concentración tal que su tiempo de coagulación quede comprendido en un rango de ± 40 segundos del tiempo de coagulación obtenido por los estándares de referencia, siendo la cantidad para cada ensayo de 0.2 mL de enzima en 10 mL de leche estándar en polvo reconstituida, tal como indica la norma. La fórmula utilizada para el cálculo es la siguiente:

$$M = \frac{t_{ref} \times 0.003 \times D \times M_{ref}}{t}$$

donde M es la actividad coagulante expresada en IMCU/mL de la muestra a estudiar; t_{ref} es el tiempo de coagulación, en segundos, del coagulante de referencia; D es el factor de dilución de la muestra a estudiar; M_{ref} es la actividad coagulante expresada en IMCU/mL del coagulante de referencia y t es el tiempo de coagulación, en segundos, del coagulante a estudio.

Monitorización de la coagulación

Para la monitorización del proceso de coagulación mediante reflectancia difusa se em-

pleó el equipo de medida CoAguLab™ (Relectronics, Inc., Lexington, KY, EEUU; www.relectronics.com). Dicho equipo consta de dos cubas cilíndricas de acero inoxidable con una capacidad de 100 mL, al que se adicionaron 80 mL de leche de cabra Murciano-Granadina. La temperatura de las cubas (32 °C) se controló mediante un baño termostático de 10 L (DIGITERM 100 SELECTA, nº serie; 0354029, Barcelona, España). Las cubas están equipadas con dos fibras ópticas, una que transmite la luz a una longitud de onda de 880 nm hasta la muestra de leche, y otra que conduce la reflectancia difusa producida por las partículas de la muestra hasta un fotodetector de silicio. El sistema calcula, a tiempo real, un perfil de reflectancia, con su primera y segunda derivada en función del tiempo, a partir del cual, se obtienen los parámetros que a continuación se relacionan (Castillo *et al.*, 2003): T_{max} : tiempo desde la adición de enzima hasta el máximo de la primera derivada (min); T_{2max} : tiempo desde la adición de enzima hasta el máximo de la segunda derivada (min); T_{2min} : tiempo desde la adición de enzima hasta el mínimo de la segunda derivada (min); R_{max} : ratio de reflectancia a tiempo T_{max} y D_{max} : máximo valor de la primera derivada.

Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados obtenidos se utilizó el Modelo Lineal General (GLM) del paquete estadístico SPSS v15.0 (2006, SPSS Ibérica 165 SLU, Madrid, España).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización del coagulante vegetal

Para el cálculo de la actividad coagulante se recurrió a la determinación del tiempo de coagulación de Berridge. Una vez determinado, se procedió al cálculo de la actividad coagulante (IMCU/mL) en base a los estándares de referencia.

Tabla 1. **Tiempo de Berridge y actividad coagulante de cuajos y enzimas coagulantes**

	Estándar quimosina	Estándar pepsina	<i>Mucor miehei</i>	80% quimosina	<i>Cynara cardunculus</i> (1)	<i>Cynara cardunculus</i> (2)
Tiempo Berridge (s)	541±12	544±21	513±23	549±9	539±27	530±27
Actividad coagulante IMCU/ml	987	990	222	185	5	5

(1): *Cardo silvestre* (*Cynara cardunculus* subsp. *flavescens*); (2): *Cardo* seleccionado por la ETSIA (*Cynara cardunculus* subsp. *cardunculus*).

En la Tabla 1 se muestran los valores medios y sus correspondientes desviaciones estándar del tiempo de Berridge y la actividad coagulante determinada en base al mismo, para cada uno de los cuajos y enzimas coagulantes empleados.

Como se aprecia en la Tabla 1, los tiempos de coagulación obtenidos para cada una de las enzimas ensayadas se ajustan a lo establecido en la norma FIL-IDF 157(1997), al no superar la diferencia de 40 segundos entre los estándares y las muestras. Posteriormente y utilizando la ecuación que se especifica en la norma FIL-IDF 157A, se calculó la actividad coagulante teniendo en cuenta tanto el tiempo de coagulación como el factor de dilución utilizado.

De la observación de los resultados se deduce que el coagulante microbiano obtenido por fermentación del cultivo *Mucor miehei* posee una mayor actividad coagulante, seguido por el cuajo de ternera (80% quimosina). Es necesario resaltar las importantes diferencias encontradas entre la actividad coagulantes de los extractos vegetales de *Cynara cardunculus* (5 IMCU/mL) y el resto de coagulantes estudiados que obtienen valores muy superiores (por ejemplo, el cuajo animal con 80% de quimosina obtiene 185 IMCU/mL). Esta menor actividad puede ser debida a que durante el proceso de extracción se realiza una dilución del 90% a partir de la cual se obtiene el extracto coagulante, por lo que la concentración de enzima de los extrac-

tos vegetales es inferior al resto de diluciones enzimáticas. Silva *et al.* (2003) obtuvieron valores muy diferentes de la actividad coagulante, siendo 174.000 IMCU/g, 1160 IMCU/g y 7556 IMCU/g para quimosina, cardosina A y cardosina B, respectivamente.

La determinación de las dosis de cuajos y enzimas coagulantes a emplear en las etapas posteriores se realizó en base a la actividad coagulante determinada en este apartado en leche en polvo estándar.

Predicción del tiempo de coagulación en función de T_{max}

Con el fin de estudiar el proceso de coagulación se recurrió al estudio de parámetros objetivos derivados del perfil de reflectancia difusa determinado mediante el empleo del sensor CoAguLabTM.

Para ello, se determinó de forma paralela el tiempo de coagulación de las enzimas estudiadas mediante el método de Berridge y mediante aplicación de reflectancia difusa (CoAguLabTM), en ambos casos el análisis se realizó sobre leche estándar. Del perfil de reflectancia se obtuvo T_{max} , definido por Castillo (2001) como el tiempo desde la adición de la enzima hasta el máximo de la primera derivada. Este parámetro óptico se relacionó con los valores de T_{clor} , obtenidos por el método Berridge.

Como se puede observar en la Tabla 2, los coeficientes de variación observados para los

distintos cuajos y enzimas coagulantes empleadas muestran valores bajos, que indican homogeneidad en los valores de cada una de las variables. Todos los resultados de T_{max} muestran valores inferiores a los que se observan de T_{clot} , determinados por el método de Berridge, lo que demuestra que el sensor CoAguLab™, en comparación con el método de Berridge tiene mayor sensibilidad a la agregación proteica (Castillo, 2001). Sin embargo, los coeficientes de variación obtenidos por el sensor son superiores, este puede ser debido a que el sensor muestra diferencias a nivel de agregación molecular que el ojo humano no puede detectar.

Para establecer un modelo de predicción del tiempo de coagulación, T_{clot} en base a T_{max} , se seleccionó un modelo de regresión lineal sin intercepto, que ha permitido valorar la predicción del tiempo de coagulación determinado por el método de Berridge, en base a los parámetros ópticos obtenidos por el sensor óptico (Tabla 3).

Como se puede observar en la Tabla 3 el modelo de predicción de T_{clot} obtenido alcanza un coeficiente de correlación elevado ($R^2=0.98$),

con un bajo error estándar de predicción (inferior a 1 minuto) siendo β_1 altamente significativa ($P<0.05$). El coeficiente β_1 del modelo es cercano a uno, lo que explica que T_{max} es un factor que ejerce una gran influencia sobre el tiempo de coagulación.

El análisis de regresión, indica un ajuste apropiado del parámetro óptico T_{max} y el tiempo de Berridge, lo que sugiere la existencia de una fuerte relación lineal entre T_{max} y T_{clot} . Esta relación señala que el empleo del sensor óptico de coagulación es un procedimiento válido para realizar medidas objetivas del tiempo de coagulación, por lo que podría utilizarse como método alternativo al tiempo de Berridge, que coincide con lo determinado por Castillo *et al.* (2000) en cuajos animales.

Evolución de parámetros ópticos durante el proceso de coagulación

Para comparar el efecto de las enzimas ensayadas sobre los parámetros de reflectancia obtenidos por el sensor se ajustaron, sobre un

Tabla 2. Valores de T_{max} y T_{clot} en las diferentes enzimas

	<i>Mucor Miehei</i>	80% quimosina	<i>Cynara cardunculus</i> (1)	<i>Cynara cardunculus</i> (2)
<i>Tmax</i>				
n	10	10	10	10
Media (s)	456.67	436.04	467.75	432.70
ds	68.3	29.97	31.97	50.14
CV	0.15	0.07	0.07	0.12
<i>Tclot</i>				
n	10	10	10	10
Media (s)	516.43	549.50	536.00	523.00
ds	21.73	11.45	7.07	23.47
CV	0.04	0.02	0.01	0.04

n: número de muestras; ds: desviación estándar; CV: Coeficiente de Variación. (1): Cardo silvestre (*Cynara cardunculus* subsp. *flavescens*); (2): Cardo seleccionado por la ETSIA (*Cynara cardunculus* subsp. *cardunculus*).

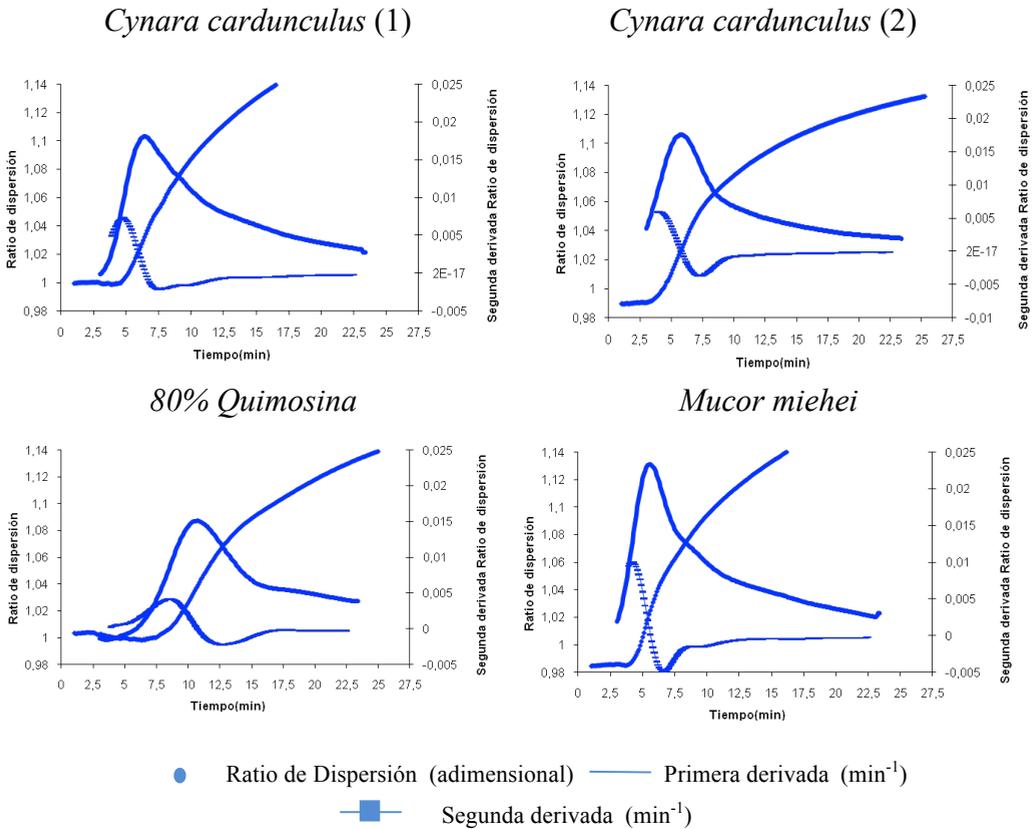


Figura 1. Perfil de reflectancia difusa de los diferentes enzimas estudiados. (1): Cardo silvestre (*Cynara cardunculus* subsp. *flavescens*); (2): Cardo seleccionado por la ETSIA (*Cynara cardunculus* subsp. *cardunculus*).

sustrato de leche estándar, las concentraciones de las enzimas a ± 40 s del tiempo de coagulación de Berridge obtenido por el cuajo con 80% de quimosina (Tabla 2). Las gráficas que a continuación se representan en la Figura 1, corresponden a la media del perfil de reflectancia difusa obtenida durante el proceso de coagulación en leche de cabra Murciano-Granadina para cada una de las enzimas ensayadas. El control del proceso de coagulación es muy importante, ya que esta fase de la fabricación del queso influye en las características del queso final y por lo tanto nos define como debemos

trabajar la cuajada para obtener mayores rendimientos y quesos de calidad (Hooydonk-Van y Walstra, 1987).

El ratio de dispersión obtenido es similar entre los coagulantes derivados de *Mucor miehei* y los extractos de *Cynara cardunculus* (1) y (2), y es diferente al que muestra el cuajo animal (80% quimosina). Aunque en los dos grupos se observa una curva sigmoideal, en las gráficas de *Mucor miehei* y *Cynara cardunculus* (1) y (2) el aumento del ratio es más acusado. Para la primera y la segunda derivada de cada uno de los ratios, se observan dife-

Tabla 3. Modelo para la predicción de T_{max}

Modelo	GL	Coficiente	R ²	EEP(min)
$T_{clot} = \beta_1 * T_{max}$	24	0.81 ***	0.98	0.99

T_{clot} : tiempo de coagulación de Berridge; T_{max} : tiempo desde la adición de enzima hasta el punto de inflexión de la curva de reflectancia; GL, Grados de Libertad; R²: coeficiente de regresión; ***P<0.001; **P<0.01; *P<0.05; ns: no significativo (P>0.05); EEP: Error Estándar de Predicción.

rencias cualitativas entre los distintos tipos de coagulantes.

Para poder realizar un estudio más detallado, se dividió todo el proceso por etapas. La primera etapa se inicia tras la incorporación del coagulante, momento en el que todas las gráficas muestran un leve descenso en el valor del ratio de reflectancia. Este descenso se debe a una disminución de la viscosidad derivada de la alteración del equilibrio micelar (resultado del inicio de la hidrólisis de la κ -caseína), que produce una disminución de la luz reflejada (López *et al.*, 1997). Este descenso aparece más tarde en el cuajo de ternera (80% quimosina). La velocidad de incremento de la reflectancia difusa de la primera derivada tiene una marcada tendencia exponencial en los coagulantes vegetales y microbiano, que se puede asociar a una proteólisis más intensa producida por la baja especificidad de estas enzimas, en contraposición con el comportamiento del cuajo de ternera (80% quimosina), que tiene un incremento más lento en el ratio de reflectancia.

La segunda etapa, situada entre el máximo de la segunda derivada (T_{2max}) y el máximo de la primera derivada (T_{max}), comprende el proceso de hidrólisis y el inicio de la agregación. En esta fase, se ha producido entre un 75-80% de la hidrólisis de la κ -caseína (Castillo, 2001), y el ratio de reflectancia aumenta progresivamente hasta alcanzar y superar su valor inicial, debido a los cambios que ocurren en la distribución de tamaño de las partículas, sobre todo de caseína, y a la unión de las micelas entre sí (Crofcheck *et al.*, 1999).

La tercera fase, que se sitúa entre los valores de T_{max} y T_{2min} (mínimo de la segunda derivada), incluye los procesos de agregación y endurecimiento de la cuajada (Castillo, 2001). Este periodo aparece más tarde para el cuajo animal (80% quimosina) en comparación con el resto de enzimas coagulantes.

En la cuarta, y última etapa, la reflectancia difusa aumenta de forma exponencial hasta alcanzar su máximo y se prolonga hasta el momento del corte de la cuajada. En este periodo se produce la estabilización de la cuajada.

En la Tabla 4 se muestra el análisis de varianza (ANOVA) de las variables derivadas del perfil de reflectancia difusa. Los valores de T_{max} , T_{2max} y T_{2min} muestran diferencias altamente significativas (P<0.001) entre los diferentes coagulantes. Estos parámetros, que están relacionados con la cinética de las distintas fases del proceso de coagulación, se comportan de manera similar en los cuatro coagulantes utilizados, como se puede observar en la Tabla 4. Para el cuajo 80% quimosina se obtienen los valores superiores en todos los parámetros (10.96 min, 9.3 min y 12.41 min para T_{max} , T_{2max} y T_{2min} , respectivamente). Los datos del coagulante vegetal de *Cynara cardunculus* (1) y de *Mucor miehei* obtienen valores medios y los valores inferiores pertenecen al coagulante vegetal *Cynara cardunculus* (2) con 5.6 min, 4.4 min y 6.85 min para T_{max} , T_{2max} y T_{2min} , respectivamente. Al analizar en profundidad estas diferencias mediante el empleo de un análisis de varianza por contrastes se observa que no existen diferencias significativas (P>0.05) entre los coagulantes ve-

Tabla 4. Valores ópticos de las enzimas estudiadas

Cuajos	T_{max} (min)	T_{2max} (min)	T_{2min} (min)	R_{max} (adim)	D_{max} (min ⁻¹)
80% quimosina	10.960	9.3000	12.410	1.0397	0.0186
<i>Cynara cardunculus</i> (1)	7.120	5.5000	8.350	1.0374	0.0236
<i>Cynara cardunculus</i> (2)	5.600	4.4000	6.850	1.0245	0.0204
<i>Mucor miehei</i>	5.830	4.6600	7.030	1.0265	0.0277
Valor Medio	7.3775	5.9650	8.6600	1.0320	0.0226
EEM	0.3779	0.3284	0.3908	0.0061	0.0023
N.S.	***	***	***	ns	*
Contrastes					
EEC					
80% vs <i>Cynara</i> (1)	0.5345 ^{***}	0.4644 ^{***}	0.5527 ^{***}	0.00859 ^{ns}	0.00326 ^{ns}
80% vs <i>Cynara</i> (2)	0.5345 ^{***}	0.4644 ^{***}	0.5527 ^{***}	0.00859 ^{ns}	0.00326 ^{ns}
80% vs <i>Mucor</i>	0.5345 ^{***}	0.4644 ^{***}	0.5527 ^{***}	0.00859 ^{ns}	0.00326 ^{**}
<i>Cynara</i> (1) vs <i>Cynara</i> (2)	0.5345 ^{ns}	0.4644 ^{ns}	0.5527 ^{ns}	0.00859 ^{ns}	0.00326 ^{ns}
<i>Cynara</i> (1) vs <i>Mucor</i>	0.5345 ^{ns}	0.4644 ^{ns}	0.5527 ^{ns}	0.00859 ^{ns}	0.00326 ^{ns}
<i>Cynara</i> (2) vs <i>Mucor</i>	0.5345 ^{ns}	0.4644 ^{ns}	0.5527 ^{ns}	0.00859 ^{ns}	0.00326 [*]
80% vs <i>Cynara</i> (1) (2)	0.9258 ^{***}	0.8044 ^{***}	0.9573 ^{***}	0.0149 ^{ns}	0.00565 ^{ns}
<i>Mucor</i> vs <i>Cynara</i> (1) (2)	0.9258 ^{ns}	0.8044 ^{ns}	0.9573 ^{ns}	0.0149 ^{ns}	0.00565 ^{ns}

EEM: Error Estándar de la Media; N.S.: Nivel de Significación, ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05, ns: no significativo (P>0.05); EEC: Error Estándar del Contraste. (1): Cardo silvestre (*Cynara cardunculus* subsp. *flavescens*); (2): Cardo seleccionado por la ETSIA (*Cynara cardunculus* subsp. *cardunculus*).

getales entre si y entre ellos y *Mucor miehei*. Sin embargo, se obtienen diferencias (P<0.01) entre el cuajo con 80% de quimosina y el resto de enzimas, lo que indica que existen diferencias en las fases de hidrólisis y agregación de la leche entre los enzimas objeto de estudio. Estos resultados no coinciden con lo señalado por Castillo (2001), que obtiene valores de T_{max} inferiores en cuajos con elevado porcentaje de quimosina frente a los coagulantes de origen vegetal y microbiano.

A pesar de que las concentraciones de las enzimas están ajustadas a un mismo tiempo de

coagulación de Berridge, los valores de T_{max} son significativamente diferentes (P<0.001). Este comportamiento observado en la leche de cabra Murciano-Granadina podría explicarse asumiendo diferentes velocidades de hidrólisis en función de la enzima, que determinarían un grado de agregación micelar diferente, observado tanto a tiempo T_{max} , como en el momento de la coagulación visible. Estos resultados coinciden con diversos autores (Hamdy, 1970; Thomasow *et al.*, 1970; Aarnes, 1972; López *et al.*, 1997), que han señalado que la actividad proteolítica es mayor en la enzima microbiana

que en el cuajo animal. Ortiz de Apocada *et al.* (1994) también observaron una mayor actividad proteolítica de *M. miehei* en comparación con cuajo de ternera y quimosina obtenida por fermentación. Es preciso señalar que entre los coagulantes vegetales, aunque no se aprecien diferencias significativas, los valores del extracto vegetal *Cynara cardunculus* (1) son ligeramente superiores, lo que indica que esta especie es menos proteolítica, por lo que el método de cultivo puede influir en la capacidad de proteólisis de este tipo de coagulantes vegetales, como indica Mendiola (2000).

En relación con el parámetro R_{max} (ratio de reflectancia a tiempo T_{max}), asociado con la rigidez de la cuajada, no se observan diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los diferentes coagulantes. Este resultado coincide con los expuestos por Castillo (2001), quien indicó que las variables de respuesta, como R_{max} , solamente presentan diferencias cuando varía la temperatura de coagulación, debido, en parte, a la aceleración de la coagulación y a su efecto directo sobre la reflectancia de la leche.

Como se observa en la Tabla 4, el parámetro D_{max} (máximo valor de la primera derivada) obtiene diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los diferentes coagulantes. El análisis de contrastes indica que solamente existen diferencias significativas entre el coagulante microbiano con el cuajo con 80% de quimosina ($P < 0.01$) y el coagulante vegetal *Cynara cardunculus* (2) ($P < 0.05$), no apreciándose diferencias significativas entre el resto de coagulantes. El parámetro D_{max} está relacionado con la velocidad de incremento del ratio, por lo que los resultados indican que el cuajo animal tiene una velocidad de incremento de la reflectancia difusa inferior a los otros coagulantes utilizados, reflejando un disminución tanto de la velocidad de hidrólisis de la κ -caseína como de la agregación micelar posterior. Al contrario que el coagulante microbiano que alcanza valores de D_{max} superiores. Según Castillo (2001), un aumento en el valor de D_{max} debería traducirse en una disminución

del resto de parámetros ópticos (T_{max} , T_{2max} , T_{2min} y R_{max}), pero los resultados obtenidos en este estudio no muestra esta correlación, como se puede apreciar en la Tabla 4, ya que el coagulante *Mucor miehei* obtiene el mayor valor de D_{max} pero es *Cynara cardunculus* (2) el coagulante que ofrece valores inferiores en el resto de parámetros ópticos.

CONCLUSIONES

El estudio del perfil de reflectancia determina la existencia de un comportamiento similar entre las enzimas coagulantes vegetales y la enzima derivada de *Mucor miehei*, siendo el coagulante vegetal una alternativa válida al coagulante microbiano, y por lo tanto podría ser utilizado en la elaboración del tipo Halal y/o Koscher. Así mismo, la introducción de coagulantes vegetales en la elaboración de quesos de leche de cabra Murciano-Granadina puede reducir el coste de fabricación y ampliar el mercado de este tipo de quesos. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que el sensor óptico CoAguLab™ puede ser considerado como un método alternativo al Método de Berridge.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la empresa Alimentos del Mediterraneo S. Coop. (Lorca, Murcia) mediante un proyecto del Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial (CDTI), entidad Pública Empresarial dependiente del Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España.

BIBLIOGRAFÍA

- AARNES, A.G. 1972. St. Paulin and Jarlsberg cheese made with Rennilase. Dairy Science Abstract 34: 132.
- BERRIDGE, N. J. 1952. Some observations on the determination of the activity of rennet. Analyst 77: 57-62.

- CASTILLO, M., PAYNE, F. A., HICKS, C. L., LÓPEZ, M. B. 2000. Predicting cutting and clotting time of coagulating goat's milk using diffuse reflectance: effect of pH, temperature and enzyme concentration. *International Dairy Journal* 10: 551- 562.
- 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., PAYNE, F. A., HICKS, C. L., LAENCINA, J., LÓPEZ, M. B. 2002. Effect of calcium and enzyme in cutting time prediction of coagulating goat's milk using a light scattering sensor. *International Dairy Journal* 12:1019-1023.
- CASTILLO M., PAYNE F.A., GONZÁLEZ R., LÓPEZ M.B., LAENCINA J. 2003. Clotting time determination by NIR. *Anales Veterinaria Universidad Murcia* 19: 23-36.
- CORDEIRO, M., JAKOB, E., PUHAN, Z., PAIS, M.S., BRODELIU, P.E. 1992. Milk clotting and proteolytic activities of purified cynarasas from *Cynara cardunculus* L. a comparison to chymosin. *Milchwissenschaft*, 47: 683-687.
- CROFCHICK, C. L., PAYNE, F. A., NOKES, S. E. 1999. Predicting the cutting time of cottage cheese using light backscatter measurements. *Transaction of the ASAE* 42(4): 1039-1045.
- ESTEVEZ, C.L.C., LUCEY, J.A., PIRES, E.M.V. 2001. Mathematical modelling of the formation of rennet-induced gels by plant coagulants and chymosin. *Journal of Dairy Research* 68:499-510.
- FAGAN, C.C., LEEDY, M., CASTILLO, M., PAYNE, F.A., O'DONNELL, C.P., & O'CALLAGHAN, D.J. 2007. Development of a light scatter sensor technology for on-line monitoring of milk coagulation and whey separation. *Journal of Food Engineering*, 83:61-67.
- HAMDY, A. 1970. Utilisation de pressure microbienne dans la fabrication du fromage "domiati". XVIII International Dairy Congress 1F 358.
- HEIMGARTNER, U., PIETRZAK, M., GEERSEN, R., BRODELIUS, P., DA SILVA, A.C., PAIS, M.S.S. 1990. Purification and partial characterization of milk clotting proteases from flowers of *Cynara cardunculus*. *Phytochemistry*, 29:1405-1410.
- HOOYDONK-VAN, A.C.M. Y WALSTRA, P. (1987). Interpretation of the kinetics of renneting reaction in milk. *Neth. Milk Dairy J* 41:19-47.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (IDF). 1997. Bovine rennets. Determination of total milk-clotting activity (Standard no. 157A). Brussels, Belgium.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (IDF). 2002. Milk and milk products. Microbial coagulants. Determination of total milk-clotting activity (Standard no. 176). Brussels, Belgium.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (IDF). 2006. Milk and milk products. Ovine and caprine rennets. Determination of total milk-clotting activity (Standard no. 199). Brussels, Belgium.
- KONING-DE, P. J. 1978. Coagulating enzymes in cheese making. *Dairy Industries International* 43:7-12.
- LÓPEZ, M. B., JORDÁN, M. J., LUNA, A., BAÑÓN, S., GARRIDO, M. D., LAENCINA, J. 1997. Diffuse reflectance profiles of goat's milk during coagulation by various enzymes. *Food Science and Technology International* 3: 299-301.
- MACEDO, I. Q., FARO, C.J., 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.
- MENDIOLA, F. J. 2000. Obtención y caracterización del coagulante de leche normalizado de origen vegetal (*Cynara cardunculus*) y

- su aplicación de queso de La Serena. Tesis Doctoral, Universidad de Extremadura, Badajoz.
- ORTIZ DE APODACA, M. J., AMIGO, L., RAMOS, M. 1994. Study of the milk-clotting and proteolytic activity of calf rennet, fermentation-produced chymosin, vegetable and microbial coagulants. *Milchwissenschaft* 49 (1): 13-16.
- PAYNE, F.A., HICKS, C.L., MADANGOPAL, S., & SHEARER, S.A. 1993. Fibre optic sensor for predicting the cutting time of coagulation milk for cheese production. *Transactions of the ASAE*, 36:841-847.
- PIRES, E., FARO, C., MACEDO, I., ESTEVES, C., MORGADO, J., VERISSIMO, P., PAREIRA, D., GÓMEZ, D. 1994. Flor de cardo versus quimosina no fabrico de queijos artesanais. *Quimica alimentaria* 54:66-68.
- ROSEIRO, L.B., BARBOSA, M., AMES, J.M., WILBEY, R. A. 2003. Cheesemaking with vegetable coagulants –the use of *Cynara L.* for the production of ovine milk cheeses. *International Journal of Dairy Technology* 56 (2): 76-85.
- SANJUÁN, E., MILLÁN, R., SAAVEDRA, P., CARMONA, M.A., GÓMEZ, R., FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. 2002. Influence of animal and vegetable rennet on the physicochemical characteristics of *Los Pedroches* cheese during ripening. *Food Chemistry* 78: 281-289.
- SILVA S.V., ALLMERE, T., MALCATA F.X., ANDREN A. 2003. Comparative studies on the gelling properties of cardosins extracted from *Cynara cardunculus* and chymosin on cow's skim milk. *International Dairy Journal* 13:559-564.
- TEJADA L., GÓMEZ R., VIOQUE M., PRADOS F. Y FERNÁNDEZ-SALGUERO J. 2005. Influencia de algunos factores sobre la actividad coagulante de extractos liofilizados de cardos de las especies *Cynara cardunculus* y *Cynara humilis*, utilizados en la elaboración de queso. *Alimentaria* 362: 122-127.
- THOMASOV, J., MROWETZ, G., SCHAMNKE, E. 1970. Untersuchungen zur Verwendung von Lab aus *Mucor miehei* zur Käseherstellung. *Kieler Milchw. Forsch. Ber.* 23, 57.
- VIEIRA DE SA, F., BARBOSA, M. 1972. Cheese-making with vegetable rennet from cardo (*Cynara cardunculus*). *Journal Dairy Research* 39: 335-343.
- VIOQUE M., GÓMEZ R. 2005A. Actividad coagulante de extractos acuosos de cardos de las especies *Cynara cardunculus* y *Cynara humilis* empleados en la elaboración de quesos tradicionales. Estudio de los factores que la modifican. *Alimentaria*, 366: 91-97.
- VIOQUE M., GÓMEZ. R. 2005B. Coagulantes vegetales empleados en la fabricación de quesos tradicionales, Caracterización de algunas variedades. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 25, 203: 48-55.