

O cardo e a indústria de queijo: ferramentas biotecnológicas para a produção de enzimas utilizadas na coagulação do leite

Thistle and the cheese industry: biotechnological tools for the production of enzymes for milk coagulation

André Folgado & Rita Abranches*

Plant Cell Biology Laboratory, Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier ITQB NOVA, Universidade Nova de Lisboa, 2780-157 Oeiras, Portugal
(*E-mail: ritaa@itqb.unl.pt)

<https://doi.org/10.19084/rca.17565>

Recebido/received: 2019.03.29

Aceite/accepted: 2019.05.24

RESUMO

Em Portugal, como noutros países da bacia mediterrânica, a planta de cardo (*Cynara cardunculus* L.) tem sido utilizada desde tempos antigos para diversas aplicações nas áreas alimentar e da saúde. Em particular, no caso da produção artesanal de queijo de cabra e ovelha, a flor do cardo tem sido usada, muitas vezes de uma forma empírica, no processo de coagulação do leite. Esta utilização deve-se ao facto da flor possuir um conjunto de enzimas, nomeadamente proteases aspárticas, que influenciam o sabor e textura característicos destes queijos. Mais recentemente, as ferramentas desenvolvidas pela biotecnologia abrem novas perspectivas para uma produção de queijo em condições controladas e a um preço mais baixo. Neste artigo é apresentada uma revisão das ferramentas biotecnológicas disponíveis e das suas potenciais aplicações nesta indústria com importante impacto a nível nacional.

Palavras-chave: cardo, queijo, protease, cardosina, proteína recombinante.

ABSTRACT

In Portugal, as in other countries of the Mediterranean basin, the thistle plant (*Cynara cardunculus* L.) has been used since ancient times for several applications in the food and health areas. In particular, in the case of artisanal goat and sheep cheese production, the thistle flower has been used, often empirically, in the milk coagulation process. This is due to the presence of a set of enzymes in the flower, in particular aspartic proteases that influence the flavor and texture characteristic of these cheeses. More recently, tools developed by biotechnology open up new prospects for controlled and low-priced cheese production. This article reviews existing biotechnology tools and their potential application in this industry with an important national impact.

Keywords: cardoon, cheese, protease, cardosin, recombinant protein.

INTRODUÇÃO

Cynara cardunculus L., vulgarmente conhecido por cardo ou cardo-do-coalho, é uma planta da família Asteraceae (Compositae). Alguns autores consideram que *C. cardunculus* inclui duas subespécies: subsp. *cardunculus* e subsp. *flavescens* Wiklund (Wiklund, 1992; Devesa e López Martínez, 2014). Outros autores consideram que a espécie inclui três variedades: o cardo silvestre (var. *cardunculus*, por vezes designada “var. *sylvestris*”), o cardo cultivado (var. *altilis* DC.) e a alcachofra (var. *scolymus* (L.) Fiori) (Rottenberg e Zohary, 1996; Sonnante *et al.*, 2007b; Acquadro *et al.*, 2017; Pavan *et al.*, 2018). A alcachofra é por vezes tratada como uma espécie diferente (*C. scolymus* L.). No entanto, cruzamentos entre alcachofra, cardo cultivado e cardo silvestre originam híbridos totalmente férteis (Rottenberg e Zohary, 1996), sendo o cardo silvestre considerado o ancestral do cardo cultivado e da alcachofra (Acquadro *et al.*, 2017). Há evidências de que a alcachofra terá sido domesticada nos tempos romanos na Sicília (Mauro *et al.*, 2009), enquanto o cardo poderá ter sido domesticado mais tarde no Mediterrâneo ocidental, possivelmente em Espanha ou França (Rottenberg e Zohary, 1996; Sonnante *et al.*, 2007a,b; Pavan *et al.*, 2018). A espécie ocorre naturalmente em toda a região Mediterrânica e na Macaronésia (Ilhas Canárias), tendo sido introduzida na América e na Austrália, onde se encontra naturalizada (Devesa e López Martínez, 2014).

Cynara cardunculus é uma espécie diploide ($2n = 2x = 34$), de polinização cruzada, apresentando um elevado grau de heterozigotia (Sonnante *et al.*, 2007b; Acquadro *et al.*, 2017). É uma planta perene que cresce até 2 metros de altura no caso do material cultivado, enquanto o material silvestre normalmente não ultrapassa os 110 cm de altura (Wiklund, 1992; Devesa e López Martínez, 2014). As suas folhas são penatipartidas ou penatifendidas, com margem espinhosa, verde-acinzentadas na parte superior e mais claras na parte inferior. Os capítulos são terminais, solitários ou têm inflorescências complexas mais ou menos corimbiformes, e estão envolvidas por brácteas coriáceas (Devesa e López Martínez, 2014). As flores têm corolas tubulosas, azul-violeta ou roxas. É uma planta adaptada às condições secas do Mediterrâneo, onde a maior parte da precipitação ocorre durante o inverno.

O cardo cultivado é germinado a partir da semente e usado como uma planta anual, enquanto a alcachofra é geralmente propagada vegetativamente (Sonnante *et al.*, 2007b).

A sequência do genoma de *C. cardunculus* var. *scolymus* foi publicada recentemente (Scaglione *et al.*, 2016; www.artichokegenome.unito.it), o que veio permitir ampliar diversos estudos genéticos. Novas ferramentas, incluindo a anotação de micro RNAs, estão agora disponíveis para um vasto leque de estudos (Acquadro *et al.*, 2017). Nos últimos anos, a diversidade genética desta espécie tem sido estudada através da avaliação morfológica, mas também recorrendo à utilização de marcadores moleculares (Pagnotta *et al.*, 2017; Barracosa *et al.*, 2018a). A avaliação da diversidade genética é importante não só para a caracterização da espécie mas também para a identificação de germoplasma que deve ser conservado ou aquele que se está a perder ou em risco de extinção.

No que diz respeito às condições de ecologia e aspectos agronómicos desta espécie, Gominho *et al.* (2018) apresenta, num artigo recente, uma extensa revisão e informações detalhadas. Apesar da inexistência de um programa nacional de melhoramento genético em cardo, alguns projetos têm sido realizados de forma a atuar sobre os problemas que envolvem a sua exploração e ao mesmo tempo contribuir para a valorização de um recurso endémico que, apesar de ser economicamente explorado, não tem sido alvo de programas de valorização. O projecto CARDOP (<http://cardop-queijoserradaestrela.blogspot.com>) liderado pelo Instituto Politécnico de Viseu, o projecto iCheese (<https://inovacao.rederural.gov.pt/13-projectos-groupos-operacionais/60-icheese-cynara-innovation-for-best-cheese>) liderado pela Universidade Católica Portuguesa, e também o projecto ValBioTec Cynara (<http://www.inia.pt/menu-lateral-geral/projetos-de-investigacao/valbiotec>) liderado pelo Centro de Biotecnologia Agrícola do Alentejo (CEBAL), são exemplos de projectos nacionais concebidos para promover o uso do cardo, não só no que à sua dimensão na produção de queijo diz respeito, mas de forma integral, explorando o cardo como um todo, aproveitando todas as partes da planta que, graças às suas características, possibilitam diferentes áreas de exploração económica.

AS DIVERSAS APLICAÇÕES DE *CYNARA CARDUNCULUS*

A utilização desta espécie pelo ser humano tem tido ao longo do tempo diversas aplicações: o talo para alimentação, as folhas que contêm numerosos compostos químicos com aplicação na saúde, o aproveitamento da biomassa, o fabrico de biodiesel, e finalmente a utilização das flores na manufatura do queijo que constitui o foco deste artigo.

A alcachofra é conhecida desde o século IV a.C. para fins alimentares e medicinais. Esta planta era apreciada pelos antigos egípcios, gregos e romanos, que a utilizavam como alimento e também como medicamento devido aos seus efeitos benéficos contra doenças hepato-biliares e para facilitar a digestão (Lattanzio *et al.*, 2009). Os extractos de folha de alcachofra são usados na medicina popular, particularmente para tratar problemas de fígado, mas também pelo seu efeito diurético e colagogo, apresentando também alguma atividade colerética e antidiabética (Lattanzio *et al.*, 2009). De facto, a espécie *Cynara cardunculus* apresenta numerosas aplicações em farmacologia uma vez que diferentes tecidos da planta constituem fontes naturais de compostos bioactivos. Além disto, o cardo tem um importante papel na nutrição humana, devido ao seu alto teor de compostos nutracêuticos e bioativos, como a inulina e os fenólicos antioxidantes (Pandino *et al.*, 2011). Entre os compostos mais estudados encontram-se os ácidos mono- e di-cafeoilquínico e as lactonas sesquiterpénicas. Em particular as lactonas sesquiterpénicas constituem uma classe de terpenóides muito diversos em termos da sua estrutura e propriedades, que desempenham um papel fundamental na interação entre plantas e ambiente e possuem propriedades aleloquímicas, dissuasivas e inseticidas. Os extractos de cardo demonstraram ainda atividade antitumoral (Mileo *et al.*, 2012) e antibacteriana (Lattanzio *et al.*, 2009). Em particular o composto cinaropicrina, presente nas folhas de cardo, já foi identificado como anti-cancerígeno e a sua ação em linhas tumorais tem sido amplamente estudada (por exemplo Eljounaidi *et al.*, 2015; Ramos *et al.*, 2017). A caracterização química dos extractos lipofílicos de folha de *Cynara cardunculus* L. var. *altilis* levou à identificação de novos compostos, no entanto as lactonas sesquiterpénicas e triterpenos pentacíclicos foram as famílias

lipofílicos mais prevalentes (Ramos *et al.*, 2013). No que diz respeito às flores, o estudo recente de Dias e colaboradores elaborou uma caracterização do perfil fenólico e da bioatividade de extractos de diferentes genótipos de *C. cardunculus*, com o foco particular nos estigmas da inflorescência, devido à sua utilização na produção de queijo (Dias *et al.*, 2018). Os compostos prevaletentes foram a apigenina e os derivados de ácido cafeoilquínico. Além da forte atividade antioxidante, as inflorescências do cardo também apresentaram atividade antibacteriana (Dias *et al.*, 2018).

O cardo também pode ser explorado para a produção de biomassa lignocelulósica e óleo de sementes (Curt *et al.*, 2002; Fernández *et al.*, 2006), produção de forragem verde para a pecuária (Cajarville *et al.*, 1999), biomassa seca para produção de energia (Gonzalez *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2012), matéria-prima para polpa de celulose e para madeira prensada (Gominho *et al.*, 2001, 2009, 2011, 2018) e biodiesel (Sengo *et al.*, 2010).

Por último, a utilização do cardo na manufatura do queijo. Embora os coalhos de origem animal tenham sido provavelmente os primeiros coagulantes enzimáticos utilizados, os coalhos produzidos a partir de plantas, como por exemplo figos e cardo, parecem ter sido comuns na época romana (Fox *et al.*, 2017). Esta aplicação do cardo irá ser desenvolvida com mais detalhe nas seções seguintes, onde serão também apresentadas as possibilidades alternativas existentes nomeadamente as que tiram partido de ferramentas biotecnológicas.

UTILIZAÇÃO DA FLOR DE CARDO COMO AGENTE COAGULANTE NA PRODUÇÃO DE QUEIJO

Em Portugal, a principal exploração económica do cardo é a utilização da sua flor na produção de queijo. No entanto, a flor é uma matéria-prima bastante onerosa para o sector; o preço depende da qualidade, variando geralmente entre 25 e 60 euros por quilo mas podendo chegar até aos 100 euros em situações de escassez (comunicação pessoal, Pedro Louro (INIAV) e Paulo Barracosa (IP Viseu)). Tal como referido anteriormente, a utilização da flor de cardo como agente na coagulação do leite é possível devido à presença de enzimas proteolíticas denominadas proteases aspárticas (PA). Estas

enzimas são responsáveis pela quebra da principal proteína do leite designada caseína. A caracterização destas proteases reveste-se de grande importância uma vez que influenciam as características específicas dos vários queijos, nomeadamente em termos de textura e sabor. Neste sentido, diversos grupos de investigação têm vindo a dedicar-se ao estudo destas enzimas, com vista a permitir no futuro utilizar ferramentas biotecnológicas para melhorar os processos de produção. Estas proteases aspárticas estão presentes nos pistilos da flor e são designadas ciprosinas e cardosinas (Cordeiro *et al.*, 1994; Verissimo *et al.*, 1995). A diferente designação destas enzimas está relacionada com os diferentes autores que as estudaram bem como as diferenças ao nível do processo de purificação utilizado aquando da sua identificação. Até agora, foram identificadas 9 PA diferentes na flor de cardo (Cordeiro *et al.*, 1994; Verissimo *et al.*, 1996; Sarmento *et al.*, 2009), que pertencem a uma família multi-génica (Pimentel *et al.*, 2007). De todas as proteínas identificadas, apenas as cardosinas C e D ainda não foram encontradas na flor de cardo sob a forma de proteína, havendo apenas informação sobre a sequência dos genes (ver Quadro 1).

As várias PA encontradas na flor do cardo apresentam diferentes atividades sobre as caseínas do leite sendo estas diferenças bem evidentes entre as cardosinas A e B. A cardosina A é mais específica

e menos proteolítica que a cardosina B na sua ação sobre as caseínas, sendo a sua atividade mais semelhante à da quimosina animal que é a enzima mais utilizada pela indústria do queijo a nível mundial. Por outro lado, a cardosina B é mais proteolítica e menos específica que a cardosina A, sendo a sua atividade mais semelhante à da pepsina animal (Verissimo *et al.*, 1995).

A diferença na atividade das enzimas está relacionada com a ação que têm sobre as proteínas que constituem o leite. O leite é constituído maioritariamente por proteínas designadas caseínas. As caseínas do leite formam uma estrutura micelar constituída por α , β e κ -caseínas. A α e a β -caseína são compostas por estruturas hidrofóbicas enquanto que a κ -caseína é constituída por estruturas hidrofóbicas e hidrofílicas. Assim, a κ -caseína é responsável pela estabilização do micelo e permite que este seja solúvel (Waugh e Von Hippel, 1956). A coagulação do leite ocorre devido à destabilização deste complexo por ação enzimática sobre a κ -caseína. A hidrólise da κ -caseína leva a que as estruturas hidrofóbicas fiquem expostas, promovendo a ligação dos micelos de caseína entre si, formando uma rede que conduz à formação do coalho do leite. Durante o processo de sinérese, que consiste na libertação de água da coalhada, as estruturas hidrofílicas permanecem no soro do leite, assim como grande parte das enzimas utilizadas

Quadro 1 - Genes e proteínas das proteases aspárticas de cardo

Protease	Gene	Proteína	Referência
Cardosina A	AJ132884.1 ^a	CAB40134.1 ^a	Verissimo <i>et al.</i> , 1996; Faro <i>et al.</i> , 1999
Cardosina B	AJ237674.1 ^a	CAB40349.1 ^a	Verissimo <i>et al.</i> , 1996; Vieira <i>et al.</i> , 2001
Cardosina C	Não depositado	-	Pimentel <i>et al.</i> , 2007
Cardosina D	Não depositado	-	
Cardosina E	-	P85136 ^b	Sarmento <i>et al.</i> , 2009
Cardosina F	-	P85137 ^b	
Cardosina G	-	P85138 ^b	
Cardosina H	-	P85139 ^b	
Ciprosina 1(A)	X69193.1 ^a	CAA48939.1 ^a	
Ciprosina 2	-	Não depositado	
Ciprosina 3(B)	X81984.1 ^a	CAA57510.1 ^a	

^a GeneBank[®] database; ^b UniProtKB database

neste processo (Walstra, 1993). A quimosina, que é a principal enzima utilizada na indústria dos laticínios, tem uma atividade muito específica sobre a κ -caseína, cortando apenas na posição dos aminoácidos Fen₁₀₅-Met₁₀₆ da proteína. Esta ação leva à produção de dois péptidos designados para- κ -caseína e macro-péptido (Delfour *et al.*, 1965). A ação das PA da flor do cardo sobre as caseínas também é caracterizada pela mesma ação sobre a κ -caseína na posição Fen₁₀₅-Met₁₀₆ (Macedo *et al.*, 1993), no entanto, a ação proteolítica é mais extensa que a da quimosina, ocorrendo também cortes noutras posições das restantes caseínas (Silva e Malcata, 1998, 1999, 2005; Silva *et al.*, 2003). Esta atividade mais alargada sobre as caseínas é apontada como uma das razões para o aparecimento de sabores amargos e picantes no queijo produzido com estas enzimas (Agboola *et al.*, 2004). As diferentes PA da flor do cardo, apesar de em alguns casos apresentarem uma grande percentagem de similitude, têm atividades específicas sobre as caseínas que são diferentes entre si. Além disto, a quantidade de cada PA presente na flor do cardo varia entre ecótipos, havendo genótipos com diferentes quantidades de cada enzima e outros em que algumas enzimas estão ausentes (Barracosa *et al.*, 2018b). Assim, a utilização do extrato de flor do cardo como agente de coagulação do leite está muito dependente da presença e da atividade específica das diferentes PA, fator que contribui, em parte, para a variabilidade encontrada no extrato produzido a partir da flor do cardo e utilizado no fabrico dos queijos.

VARIABILIDADE GENÉTICA E IMPACTO NO FABRICO DE QUEIJO

A utilização de flor do cardo na produção de queijo está intrinsecamente associada à produção de queijo de Denominação de Origem Protegida (DOP). Para os queijos poderem adquirir esta classificação, a sua produção tem que ser feita, obrigatoriamente, com a utilização de flor de cardo como agente de coagulação do leite. Além disso, o leite utilizado tem que ser obtido a partir de raças autóctones e ser produzido na área geográfica definida no caderno de especificações e regulado pela legislação em vigor (ver por exemplo DR-Despacho n.º 4183/2011 relativo ao queijo da Serra da Estrela). Segundo Almeida & Simões (2018), existem sete queijos portugueses de cabra ou ovelha com a designação DOP, que utilizam somente extratos de

flor de cardo como coagulante. Estes queijos apresentam propriedades sensoriais e de textura únicas, as quais são atribuídas a uma proteólise mais pronunciada da caseína por parte das enzimas do cardo, quando comparada com as de origem animal. Para uma revisão recente sobre este tema consultar Almeida e Simões (2018).

As flores utilizadas na produção de queijos DOP variam consoante o fabricante, sendo que alguns fabricantes utilizam flores de plantações próprias enquanto outros compram a flor a fornecedores ou em feiras regionais. Se no primeiro caso é possível garantir que a origem da flor é controlada, no segundo caso tal não é possível. Associado a isto, a inexistência de produtores de flor de cardo leva a que a colheita ocorra de forma aleatória e desordenada incluindo também plantas que crescem de forma espontânea na natureza. Fatores como a falta de controlo na origem da flor, das partes que são colhidas e do seu estado de secagem, contribuem para uma maior variabilidade no perfil de cardosinas e cipsosinas presentes durante o processo de produção do extrato enzimático. Esta variabilidade pode levar à obtenção de extratos com diferentes forças de coagulação que vão afetar o processo de fabrico dos queijos. A variabilidade dos extratos de flor de cardo usados no processo de coagulação do leite no fabrico de queijo tem sido tema de alguns estudos durante os últimos anos. Correia *et al.* (2016) avaliou o impacto de diferentes ecótipos de cardo na produção de queijo Serra da Estrela. Os autores utilizaram 4 ecótipos diferentes e mediram parâmetros como tempo de coagulação, textura, firmeza, peso e cor e realizaram também uma avaliação sensorial recorrendo a um painel de provadores. Os resultados obtidos mostraram grande variabilidade nos parâmetros medidos, especialmente em relação ao tempo de coagulação. A avaliação sensorial também mostrou diferenças significativas realçando o impacto que a escolha da flor tem no produto final (Correia *et al.*, 2016). No entanto, os autores mediram a quantidade de cardosinas total e por isso não foi possível relacionar o tipo e conteúdo em cardosinas com o produto final (Correia *et al.*, 2016). O tema da variabilidade encontrada nas populações de cardo foi recentemente abordado em dois estudos. O primeiro estudo abrangeu 6 ecótipos de cardo, tendo sido caracterizado, ao longo de três anos, o perfil em cardosinas em conjunto com a avaliação de 26

características morfológicas, de forma a averiguar alguma possível correlação entre o perfil enzimático e o fenótipo das plantas (Barracosa *et al.*, 2018b). De acordo com este estudo, os perfis enzi-

do produto final. No Quadro 2 podem ser encontrados exemplos de coalhos de diferentes origens disponíveis no mercado.

Quadro 2 - Exemplos de coalhos disponíveis no mercado

Coalhos	Características	Website/Referência
Maxiren®	Quimosina recombinante produzida por fermentação em <i>Kluyveromyces lactis</i>	https://www.dsm.com/markets/food-specialties/en/products/dairy/maxiren.html
CHY-MAX®	Quimosina recombinante produzida por fermentação em <i>Aspergillus niger</i>	https://www.chr-hansen.com/pt/food-cultures-and-enzymes/cheese/cards/product-cards/chy-max
NATUREN®	Coalho animal extraído a partir do quarto estômago de bezerros e cordeiros	https://www.chr-hansen.com/pt/food-cultures-and-enzymes/cheese/cards/product-cards/naturen
Cynzime™	Coalho vegetal produzido a partir de flores de cardo secas. Extrato enzimático concentrado e normalizado	http://www.fytozimus.com/products.html
MICROLANT® SUPREME	Coagulante microbiano produzido por fermentação de <i>Rhizomucor miehei</i>	https://www.chr-hansen.com/pt/food-cultures-and-enzymes/cheese/cards/product-cards/microlant-supreme
Coagulante Vegetal Abiasa	Coalho vegetal produzido a partir de extrato de flores de cardo secas	https://www.abiasaartesanal.com
VRen	Cardosina B sintética produzida por fermentação em <i>Kluyveromyces lactis</i>	Almeida <i>et al.</i> , 2015 (ainda não disponível no mercado)

máticos apresentaram variações na quantidade e também na qualidade de cardosinas nos ecótipos utilizados, não tendo sido possível encontrar correlação entre a morfologia e o perfil enzimático dos ecótipos. Foi no entanto possível detetar alguma estabilidade nos perfis enzimáticos dentro de cada ecótipo ao longo dos três anos de amostragens (Barracosa *et al.*, 2018b). No segundo trabalho, foram caracterizados extratos de flor de 15 ecótipos de cardo da região do Alentejo em relação à sua utilização como agente coagulante de leite tendo sido consideradas 13 características técnicas para avaliar o desempenho de cada extrato na coagulação do leite (Gomes *et al.*, 2019). Estes autores constataram mais uma vez a grande variabilidade existente nas diferentes populações de cardo, nomeadamente na sua utilização como agente coagulante, reforçando que a falta de controlo sobre a proveniência das flores e a sua mistura são fatores que contribuem para a imprevisibilidade associada ao uso do cardo na produção de queijo (Gomes *et al.*, 2019). Estes trabalhos vêm demonstrar, a diferentes níveis, a grande variabilidade genética que caracteriza as populações de cardo e mostrar a sua influência no processo de fabrico de queijo e na qualidade

POTENCIAL DE INOVAÇÃO E CRIAÇÃO DE NOVOS PRODUTOS

Os estudos realizados sobre a variabilidade das populações de cardo e o impacto que esta tem sobre o queijo produzido, vêm confirmar aquilo que já era empiricamente conhecido, sobre a variação dos queijos produzidos através da utilização de flor de cardo. O impacto que esta variabilidade tem sobre o processo de fabrico é muitas vezes reduzido devido à dimensão artesanal que caracteriza a produção de queijo com a utilização de cardo. No entanto, este fator limita a utilização da flor numa escala de produção industrial na qual a existência de variabilidade tem um impacto superior.

A utilização das flores do cardo na produção de queijo implica a influência da presença de todas, ou de grande parte, das PA da flor no processo de coagulação do leite. Tendo em conta que as diferentes PA têm atividades específicas, o produto final é o resultado da ação conjunta de várias PA, não sendo possível distinguir os contributos individuais de cada enzima. Assim, a aplicação prática do conhecimento gerado sobre as diferentes

atividades e especificidades das PA ainda não é uma realidade. O conhecimento da atividade proteolítica e especificidade de cada enzima poderá ser um fator impulsionador e gerador de inovação ao nível da obtenção de novos produtos com o uso específico de uma enzima ou combinações das diferentes enzimas presentes no cardo. Alguns estudos foram já realizados com o objetivo de desenvolver sistemas alternativos para a expressão e produção das PA de cardo. O primeiro sistema a ser explorado foi a utilização de cultura de tecidos da própria planta de cardo. Figueiredo *et al.* (1987) estabeleceu culturas de células em suspensão a partir de folhas de cardo com o intuito futuro de utilizar estas células indiferenciadas como fonte alternativa de PA de cardo. Neste trabalho, foram estabelecidas com sucesso as culturas de células indiferenciadas e otimizado o meio de cultura usado na sua indução. Mais tarde, Lima-Costa *et al.* (1996) estudaram o crescimento destas culturas em sistema contínuo em quimiostato e mediram a atividade proteolítica e a produção de fenol tendo comparado a produção destas culturas em *batch*. As culturas em quimiostato demonstraram uma maior atividade proteolítica total sem a produção de fenol em comparação com as culturas em *batch*. No entanto, a classe das proteases não foi determinada e como tal não foi possível estabelecer se a actividade proteolítica medida se deveu à actividade de PA (Lima-Costa *et al.*, 1996). Estas culturas foram posteriormente caracterizadas em relação à expressão de PA; Oliveira *et al.* (2010) estudaram a expressão das cardosinas A e B em *callus* de cardo e demonstraram a produção *de novo* destas cardosinas, sendo estas acumuladas ao nível do retículo endoplasmático no seu estado não processado. Para se encontrarem no estado processado, estas PA passam por processos sucessivos de ativação em que segmentos da sequência são removidos de forma a tornar as PA ativas. Entre estas partes removidas encontram-se o prosegmento e o *Plant Specific Insert* (PSI) (Castanheira *et al.*, 2005). Este trabalho permitiu demonstrar que estas culturas produzem cardosinas, mas o seu processamento é diferente daquele encontrado ao nível das flores (Oliveira *et al.*, 2010). Assim, o uso de culturas de *callus* de cardo como fonte alternativa de PA não representa uma solução viável. A produção à escala industrial destas enzimas tem que ter por base um sistema que permita escalabilidade. Nesse sentido, a expressão de cipsosina B, outra PA presente nas

flores de cardo, foi estudada em *Pichia pastoris* e *Saccharomyces cerevisiae*. A expressão em *Pichia pastoris* de cipsosina B resultou na sua acumulação no meio de cultura na sua forma processada, no entanto, o processamento da enzima levou a uma remoção incompleta do PSI, originando uma forma que difere da cipsosina B encontrada na flor de cardo. Isto conduz a diferenças em termos de estrutura e eficiência catalítica (White *et al.*, 1999). O mesmo foi observado, mais recentemente, com a expressão de uma PA de *Galium verum* L., também conhecida por erva-coalheira, em *Pichia pastoris* (Feijoo-Siota *et al.*, 2018). A expressão em *Saccharomyces cerevisiae* originou diferentes resultados: neste sistema, a cipsosina B recombinante foi em parte secretada para o meio de cultura na sua forma ativa e inativa, no entanto, o processo de secreção é limitado e uma parte significativa foi retida dentro das células. Isto torna o processo de fermentação dependente da produção de biomassa e limita o seu uso industrial (Sampaio *et al.*, 2008). Noutro estudo, Sampaio *et al.* (2010), procederam à produção de cipsosina B recombinante através da transformação genética de *callus* de cardo de forma a sobreexpressar a cipsosina B e caracterizaram a sua produção em bioreactor. Os autores demonstraram a capacidade deste sistema para produzir a cipsosina B na sua forma ativa, sendo esta acumulada dentro das células. Apesar de ter sido possível purificar a proteína, a quantidade produzida é ainda fator limitante para o seu uso a uma escala industrial (Sampaio *et al.*, 2010). Estes estudos permitiram perceber que a forma de expressão desta enzima em sistemas alternativos está muito dependente do sistema utilizado. De facto, um dos problemas associados à produção de PA de cardo em sistemas heterólogos, é o seu diferente comportamento nestes sistemas. Um sistema que funcione para uma enzima poderá não funcionar para outra. Mais recentemente, Almeida *et al.* (2015) desenvolveram uma estratégia que permite a produção e secreção de cardosina B sintética em levedura recorrendo a técnicas de engenharia de proteínas. Neste trabalho, as alterações introduzidas na estrutura da enzima caracterizam-se pela remoção do PSI e pela união das duas subunidades através de um *linker* constituído por glicinas. Esta estratégia permitiu que esta forma sintética da cardosina B fosse produzida e secretada para o meio de cultura na sua forma inativa, sendo necessário um passo posterior de ativação para obter a

enzima funcional (Almeida *et al.*, 2015). Neste trabalho foi também demonstrada a aplicação prática do extrato enriquecido com esta forma alternativa da cardosina B, designado VRen, na produção de queijo (Almeida *et al.*, 2015). O impacto destas alterações estruturais na atividade e especificidade da enzima foram estudadas e revelaram que, para além de permitirem a secreção para o meio de cultura, estas também originaram alterações ao nível da especificidade da proteína, tornando-a mais específica e menos proteolítica (Almeida *et al.*, 2017). Estes trabalhos vêm demonstrar a possibilidade da produção em larga escala da cardosina B sintética e o enorme potencial de inovação que existe com a aplicação de engenharia de proteínas.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Nos últimos anos, diferentes estratégias têm vindo a ser desenvolvidas em busca de formulações mais standardizadas das enzimas nativas, ou com vista à sua produção em sistemas heterólogos. A nossa equipa em particular, tem vindo a desenvolver sistemas alternativos, baseados em plantas, para a produção de proteínas recombinantes de diversas origens, nomeadamente enzimas utilizadas em alimentação animal (fitase, um aditivo de ração animal) e proteínas humanas com impacto na área da saúde, tais como a hormona Eritropoietina e a enzima prostaglandina D sintase (Abranches *et al.*, 2005; Pires *et al.*, 2008, 2012, 2014). Mais recentemente, temos focado a nossa atenção na utilização de culturas de células em suspensão da planta leguminosa *Medicago truncatula* Gaertn. e de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) (Santos *et al.*, 2016, 2017, 2018, 2019). Neste âmbito, temos vindo a desenvolver sistemas alternativos para a produção das proteases aspárticas do cardo, em particular as cardosinas A e B, de modo a obter uma fonte segura e económica, de origem vegetal, para a produção de enzimas para coagulação do leite de cabra e ovelha. Estes sistemas permitem além disso, a produção

de várias enzimas em simultâneo, produzidas em quantidades diferentes através da utilização de sequências de promotores com diferentes forças, de modo a conseguir um balanço adequado entre todos os componentes do coalho. Por essa razão é tão importante a caracterização pormenorizada das várias proteases presentes na flor do cardo e a compreensão do modo como cada uma delas contribui para uma determinada característica do queijo. Além dos sistemas de culturas de células em suspensão, estamos também a investir no estabelecimento de culturas de *hairy roots*, uma plataforma de produção mais especializada do que as células em suspensão que são indiferenciadas, pois as *hairy roots* são tecidos diferenciados e permitem obter outro tipo de produtos. Esperamos no futuro breve poder contribuir para o aparecimento de novas ferramentas biotecnológicas para a manufatura do queijo de cabra e ovelha para aplicação em diferentes sectores: um sector mais especializado, se for usada apenas uma determinada enzima com vista a uma determinada característica de sabor ou textura; queijos com custo de produção menor como os queijos de qualidade elevada mas sem selo DOP; ou para exportação no caso de mercados externos onde não existem estes requisitos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Susana S. Neves pela revisão da descrição botânica da espécie e Ana Paula Santos pela leitura crítica do manuscrito.

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT, Portugal) através do projecto “Proteases from *Cynara cardunculus* L.: study of gene expression and establishment of alternative production platforms” (ref. PTDC/BAA-AGR/30447/2017), a unidade de investigação Bioresources 4 Sustainability (ref. UID/Multi/04551/2013), e a bolsa de doutoramento de AF (ref. PD/BD/114488/2016).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abranches, R.; Marcel, S.; Arcalis, E.; Altmann, F.; Fevereiro, P. & Stoger, E. (2005) – Plants as bioreactors: a comparative study suggests that *Medicago truncatula* is a promising production system. *Journal of Biotechnology*, vol. 120, n. 1, p. 121-134. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.04.026>
- Acquadro, A.; Barchi, L.; Portis, E.; Mangino, G.; Valentino, D.; Mauromicale, G. & Lanteri, S. (2017) – Genome reconstruction in *Cynara cardunculus* taxa gains access to chromosome-scale DNA variation. *Scientific Reports*, vol. 7, art. 5617. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05085-7>
- Agboola, S.; Chen, S. & Zhao, J. (2004) – Formation of bitter peptides during ripening of ovine milk cheese made with different coagulants. *Lait*, vol. 84, n. 6, p. 567-578. <https://doi.org/10.1051/lait:2004032>
- Almeida, C.M.; Gomes, D, Faro C & Simões, I. (2015) – Engineering a cardosin B-derived rennet for sheep and goat cheese manufacture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 99, n. 1, p. 269-281. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5902-5>
- Almeida, C.M.; Manso, J.A.; Figueiredo, A.C.; Antunes, L.; Cruz, R.; Manadas, B.; Bur, D.; Pereira, P.J.B.; Faro, C. & Simões, I. (2017) – Functional and structural characterization of synthetic cardosin B-derived rennet. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 101, n. 18, p. 6951-6968. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8445-8>
- Almeida, C.M. & Simões, I. (2018) – Cardoon-based rennets for cheese production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 102, n. 11, p. 4675-4686. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9032-3>
- Barracosa, P.; Oliveira, J.; Barros, M. & Pires, E. (2018a) – Morphological evaluation of cardoon (*Cynara cardunculus* L.): assessing biodiversity for applications based on tradition, innovation and sustainability. *Genetic Resources and Crop Evolution*, vol.65, n. 1, p. 17-28. <https://doi.org/10.1007/s10722-017-0579-0>
- Barracosa, P.; Rosa, N.; Barros, M. & Pires, E. (2018b) – Selected Cardoon (*Cynara cardunculus* L.) Genotypes Suitable for PDO Cheeses in Mediterranean Regions. *Chemistry & Biodiversity*, vol. 15, n. 7, art. e1800110. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201800110>
- Brodelius, P.E.; Cordeiro, M.; Mercke, P.; Domingos, A.; Clemente, A. & Pais, M.S. (1998) – Molecular cloning of aspartic proteinases from flowers of *Cynara cardunculus* SUBSP. *flavescens* CV. cardoon and *Centaurea calcitrapa*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 436, p. 435-439. http://doi.org/10.1007/978-1-4615-5373-1_59
- Cajarville, C.; González, J.; Repetto, J.L.; Rodríguez, C.A. & Martínez, A. (1999) – Nutritive value of green forage and crop by-products of *Cynara cardunculus*. *Annales de Zootechnie*, vol. 48, n. 5, p. 353-365. <https://doi.org/10.1051/animres:19990503>
- Castanheira, P.; Samyn, B.; Sergeant, K.; Clemente, J.C.; Dunn, B.M.; Pires, E.; Beeumen, J.V.; & Faro, C. (2005) – Activation, Proteolytic Processing and Peptide Specificity of Recombinant Cardosin A. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, n. 13, p.13047-13054. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412076200>
- Cordeiro, M.C.; Pais, M.S. & Brodelius, P.E. (1994) – Tissue-specific expression of multiple forms of cyprosin (aspartic proteinase) in flowers of *Cynara cardunculus*. *Physiologia Plantarum*, vol. 92, n. 4, p. 645-653. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1994.tb03035.x>
- Correia, P.; Vítor, A.; Tenreiro, M.; Correia, A.C.; Madaleno, J. & Guiné, R. (2016) – Effect of different thistle flower ecotypes as milk-clotting in Serra da Estrela cheese. *Nutrition & Food Science*, vol. 46, p. 458-475. <https://doi.org/10.1108/NFS-12-2015-0157>
- Curt, M.D.; Sanchez, G. & Fernandez, J. (2002) – The potential of *Cynara cardunculus* L. for seed oil production in a perennial cultivation system. *Biomass & Bioenergy*, vol. 23, n. 1, p. 33-46. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(02\)00030-2](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(02)00030-2)
- Delfour, A.; Jollès, J.; Alais, C. & Jollès, P. (1965) – Caseino-glycopeptides: Characterization of a methionine residue and of the N-terminal sequence. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 19, n. 4, p. 452-455. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(65\)90145-2](https://doi.org/10.1016/0006-291X(65)90145-2)
- Devesa, J.A. & López Martínez (2014) – *Cynara* L. In: Devesa, J.A.; Quintanar, A. e García, M.Á. (Eds.) – *Flora iberica: plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares*, vol. 16 (Compositae), parte I, p. 107-120.
- Dias, M.I.; Barros, L.; Barreira, J.M.C.; Alves, M.J.; Barracosa, P. & Ferreira, I.C.F.R. (2018) – Phenolic profile and bioactivity of cardoon (*Cynara cardunculus* L.) inflorescence part: Selecting the best genotype for food applications. *Food Chemistry*, vol. 268, vol. 196-202. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.081>

- Eljounaidi, K.; Comino, C.; Moglia, A.; Cankar, K.; Genre, A.; Hehn, A.; Bourgaud, F.; Beekwilder, J. & Lanteri, S. (2015) – Accumulation of cynaropicrin in globe artichoke and localization of enzymes involved in its biosynthesis. *Plant Science*, vol. 239, p. 128-136. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.07.020>
- Faro, C.; Ramalho-Santos, M.; Vieira, M.; Mendes, A.; Simões, I.; Andrade, R.; Veríssimo, P.; Lin, X.; Tang, J. & Pires, E. (1999) – Cloning and characterization of cDNA encoding cardosin A, all RGD-containing plant aspartic proteinase. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, n. 40, p. 28724-28729. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.40.28724>
- Fernández, J.; Curt, M.D. & Aguado, P.L. (2006) – Industrial applications of *Cynara cardunculus* L. for energy and other uses. *Industrial Crops and Products*, vol. 24, n. 3, p. 222-229. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2006.06.010>
- Feijoo-Siota, L, Rama, J.; Sánchez-Pérez, A. & Villa, T. (2018) – Expression, activation and processing of a novel plant milk-clotting aspartic protease in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, vol. 268, p. 28-39. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.01.006>
- Figueiredo, A.C.; Fevereiro, P.; Cabral, J.M.S.; Novais, J.M. & Pais, M.S. (1987) – Callus and suspension cultures for biomass production of *Cynara cardunculus* (Compositae). *Biotechnology Letters*, vol. 9, n. 3, p. 213-218. <https://doi.org/10.1007/BF01024569>
- Fox, P.F.; Guinee, T.P.; Cogan, T.M. & McSweeney, P.L.H. (2017) – Cheese: historical aspects. In: *fundamentals of cheese science*. Springer US, Boston, pp 1-10.
- Gomes, S.; Belo, A.T.; Alvarenga, N.; Dias, J.; Lage, P.; Pinheiro, C.; Pinto-Cruz, C.; Brás, T.; Duarte, M.F. & Martins, A.P.L. (2019) – Characterization of *Cynara cardunculus* L. flower from Alentejo as a coagulant agent for cheesemaking. *International Dairy Journal*, vol. 91, p. 178-184. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.09.010>
- Gominho, J.; Fernandez, J. & Pereira, H. (2001) – *Cynara cardunculus* L. a new fibre crop for pulp and paper production. *Industrial Crops and Products*, vol. 13, n. 1, p. 1–10. [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(00\)00044-3](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(00)00044-3)
- Gominho, J.; Lourenço, A.; Curt, M.; Fernández, J. & Pereira, H. (2009) – Characterization of hairs and pappi from *Cynara cardunculus* capitula and their suitability for paper production. *Industrial Crops and Products*, vol. 29, n. 1, p. 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.04.022>
- Gominho, J.; Lourenço, A.; Palma, P.; Lourenço, M.E.; Curt, M.D.; Fernández, J. & Pereira, H. (2011) – Large scale cultivation of *Cynara cardunculus* L. for biomass production— A case study *Industrial Crops and Products*, vol. 33, n. 1, p. 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.09.011>
- Gominho, J.; Curt, M.D.; Lourenço, A.; Fernández, J. & Pereira, H. (2018) – *Cynara cardunculus* L. as a biomass and multi-purpose crop: A review of 30 years of research. *Biomass & Bioenergy*, vol. 109, p. 257-275. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.01.001>
- Gonzalez, J.F.; Gonzalez-Garcia, C.M.; Ramiro, A.; Gonzalez, J.; Sabio, E.; Ganan, J. & Rodriguez, M.A. (2004) – Combustion optimization of biomass residue pellets for domestic heating with a mural boiler. *Biomass & Bioenergy*, vol. 27, n. 2, p. 145–154. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2004.01.004>
- Heimgratner, U.; Pietrzak, M.; Geertsen, R.; Brodelius, P.; Figueiredo, A.C.S.; Pais, M.S. (1990) – Purification and Partial Characterization of Milk Clotting. *Phytochemistry*, vol. 29, n. 5, p. 1405-1410. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)80090-4](https://doi.org/10.1016/0031-9422(90)80090-4)
- Lattanzio, V.; Kroon, P.A.; Linsalata, V. & Cardinali, A. (2009) – Globe artichoke: A functional food and source of nutraceutical ingredients. *Journal of Functional Foods*, vol. 1, n. 2, p. 131-144. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2009.01.002>
- Lima Costa, M.E.; Van Gulik, W.M.; Ten Hoopen, J.G.; Pais, M.S. & Cabral, J.M.S. (1996) – Protease and phenol production of *Cynara cardunculus* L. cell suspension in a chemostat. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 19, n. 7, p. 493-500. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(96\)00058-0](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(96)00058-0)
- Macedo, I.Q.; Faro, C.J. & Pires, E.M. (1993) – Specificity and kinetics of the milk-clotting enzyme from cardoon (*Cynara cardunculus* L.) toward bovine κ -casein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 41, n. 10, p. 1537-1540. <https://doi.org/10.1021/jf00034a001>
- Mauro, R.; Portis, E.; Acquadro, A.; Lombardo, S.; Mauromicale, G. & Lanteri, S. (2009) – Genetic diversity of globe artichoke landraces from Sicilian small-holdings: implications for evolution and domestication of the species. *Conservation Genetics*, vol. 10, n. 2, p. 431-440. <https://doi.org/10.1007/s10592-008-9621-2>
- Mileo, A.M.; Di Venere, D.; Linsalata, V.; Fraioli, R. & Micedei, S. (2012) – Artichoke polyphenols induce apoptosis and decrease the invasive potential of the human breast cancer cell line MDA-MB231. *Journal of Cellular Physiology*, vol. 227, n. 9, p. 3301-3309. <https://doi.org/10.1002/jcp.24029>

- Oliveira, I.; Gominho, J.; Diberardino, S. & Duarte, E. (2012) – Characterization of *Cynara cardunculus* L. stalks and their suitability for biogas production. *Industrial Crops and Products*, vol. 40, p. 318–323. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.03.029>
- Oliveira, A.; Pereira, C.; Costa, D.S.; Teixeira, J.; Fidalgo, F. Pereira, S. & Pissarra, J. (2010) – Characterization of aspartic proteinases in *C. cardunculus* L. callus tissue for its prospective transformation. *Plant Science*, vol. 178, n. 2, p. 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.11.008>
- Pagnotta, M.A.; Fernández, J.A.; Sonnante, G. & Egea-Gilabert, C. (2017) – Genetic diversity and accession structure in European *Cynara cardunculus* collections. *PLoS One*, vol. 12, n. 6, art. e0178770. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178770>
- Pandino, G.; Lombardo, S.; Mauromicale, G. & Williamson, G. (2011) – Phenolic acids and flavonoids in leaf and floral stem of cultivated and wild *Cynara cardunculus* L. genotypes. *Food Chemistry*, vol. 126, n. 2, p. 417–422. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.001>
- Pavan, S.; Curci, P.L.; Zuluaga, D.L.; Blanco, E. & Sonnante, G. (2018) – Genotyping-by-sequencing highlights patterns of genetic structure and domestication in artichoke and cardoon. *PLoS One*, vol. 13, n. 10, art. e0205988. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205988>
- Pimentel, C.; Van Der Straeten, D.; Pires, E.; Faro, C. & Rodrigues-Pousada, C. (2007) – Characterization and expression analysis of the aspartic protease gene family of *Cynara cardunculus* L. *FEBS Journal*, vol. 274, n. 10, p. 2523–2539. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05787.x>
- Pires, A.S.; Cabral, M.G.; Fevereiro, P.; Stoger, E. & Abranches, R. (2008) – High levels of stable phytase accumulate in the culture medium of transgenic *Medicago truncatula* cell suspension cultures. *Biotechnology Journal*, vol. 3, n. 7, p. 916–923. <https://doi.org/10.1002/biot.200800044>
- Pires, A.S.; Rosa, S.; Castanheira, S.; Fevereiro, P. & Abranches R. (2012) – Expression of a recombinant human Erythropoietin in suspension cell cultures of Arabidopsis, Tobacco and Medicago. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, vol. 110, n. 1, p. 171–181. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0141-x>
- Pires, A.S.; Santos, R.B.; Nogueira, A.C. & Abranches, R. (2014) – Production of human Lipocalin-type Prostaglandin D synthase in the model plant *Medicago truncatula*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, vol. 50, n. 2, p. 276–281. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9584-y>
- Ramos, P.A.; Guerra, A.R.; Guerreiro, O.; Freire, C.S.; Silva, A.M.; Duarte, M.F. & Silvestre A.J. (2013) – Lipophilic extracts of *Cynara cardunculus* L. var. *altilis* (DC): a source of valuable bioactive terpenic compounds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, vol. 61, n. 35, p. 8420–8429. <https://doi.org/10.1021/jf402253a>
- Ramos, P.A.B.; Guerra, A.R.; Guerreiro, O.; Santos, S.A.O.; Oliveira, H.; Freire, C.S.R.; Silvestre A.J.D. & Duarte, M.F. (2017) – Antiproliferative Effects of *Cynara cardunculus* L. var. *altilis* (DC) Lipophilic Extracts. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 18, n. 1, art. 63. <https://doi.org/10.3390/ijms18010063>
- Rottenberg, A. & Zohary, D. (1996) – The wild ancestry of the cultivated artichoke. *Genetic Resources and Crop Evolution*, vol. 43, n. 1, p. 53–58. <https://doi.org/10.1007/BF00126940>
- Sampaio, P.N.; Fortes, A.M.; Cabral J.M.; Pais, M.S. & Fonseca, L.P. (2008) – Production and characterization of recombinant cyprosin B in *Saccharomyces cerevisiae* (W303-1A) strain. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 105, n. 4, p. 305–312. <https://doi.org/10.1263/jbb.105.305>
- Sampaio, P.N.; Neto, H.; Poejo, P.; Serrazina, S.M. & Pais, M.S. (2010) – Overexpression and characterization of cyprosin B in transformed suspension cells of *Cynara cardunculus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, vol. 101, n. 3, p. 311–321. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9690-z>
- Santos, R.B.; Abranches, R.; Fischer, R.; Sack, M. & Holland, T. (2016) – Putting the spotlight back on plant suspension cultures. *Frontiers in Plant Science*, vol. 7, art. 297. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00297>
- Santos, R.B.; Pires, A.S. & Abranches R. (2017) – Addition of a histone deacetylase inhibitor increases recombinant protein expression in *Medicago truncatula* cell cultures. *Scientific Reports*, vol. 7, art. 16756. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17006-9>
- Santos, R.B.; Chandra, B.; Mandal, M.K.; Kaschani, F.; Kaiser, M.; Both, L.; van der Hoorn, R.A.L.; Schiermeyer, A. & Abranches R. (2018) – Low protease content in *Medicago truncatula* cell cultures facilitates recombinant protein production. *Biotechnology Journal*, vol. 13, n. 7, art. e1800050. <https://doi.org/10.1002/biot.201800050>

- Santos, R.B.; Pires, A.S.; van der Hoorn, R.A.L.; Schiermeyer, A. & Abranches, R. (2019) – Generation of transgenic cell suspension cultures of the model legume *Medicago truncatula*: A rapid method for *Agrobacterium* mediated gene transfer. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, vol. 136, n. 3, p. 445-450. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1525-3>
- 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. & Barros, M.T. (2009) – Multiplicity of aspartic proteinases from *Cynara cardunculus* L. *Planta*, vol. 230, n. 2, p. 429-439. <https://doi.org/10.1007/s00425-009-0948-9>
- Scaglione, D.; Reyes-Chin-Wo, S.; Acquadro, A.; Froenicke, L.; Portis, E.; Beitel, C.; Tirone, M.; Mauro, R.; Lo Monaco, A.; Mauromicale, G.; Faccioli, P.; Cattivelli, L.; Rieseberg, L.; Michelmore, R. & Lanteri, S. (2016) – The genome sequence of the outbreeding globe artichoke constructed *de novo* incorporating a phase-aware low-pass sequencing strategy of F1 progeny. *Scientific Reports*, vol. 6, art. 19427. <https://doi.org/10.1038/srep19427>
- Sengo, I.; Gominho, J.; d'Orey, L.; Martins, M.; d'Almeida Duarte, E.; Pereira, H. & Ferreira-Dias, S. (2010) – Response surface modeling and optimization of biodiesel production from *Cynara cardunculus* oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 112, n. 3, p. 310–320. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200900135>
- Silva, S.V. & Malcata, F.X. (1998) – Proteolysis of ovine caseins by cardosin A, an aspartic acid proteinase from *Cynara cardunculus* L. *Lait*, vol. 78, n. 5, p. 513-519. <https://doi.org/10.1051/lait:1998548>
- Silva, S.V. & Malcata, F.X. (1999) – On the activity and specificity of cardosin B, a plant proteinase, on ovine caseins. *Food Chemistry*, vol. 67, n. 4, p. 373-378. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00126-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00126-0)
- Silva, S.V.; Allmere, T.; Malcata, F.X. & Andrén, A. (2003) – Comparative studies on the gelling properties of cardosins extracted from *Cynara cardunculus* and chymosin on cow's skim milk. *International Dairy Journal*, vol. 13, n. 7, p. 559-564. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00075-X](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00075-X)
- Silva, S.V. & Malcata F.X. (2005) – Studies pertaining to coagulant and proteolytic activities of plant proteases from *Cynara cardunculus*. *Food Chemistry*, vol. 89, n. 1, p. 19-26. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.074>
- Sonnante, G.; Carluccio, A.V.; Vilatersana, R. & Pignone D. (2007a) – On the origin of artichoke and cardoon from the *Cynara* gene pool as revealed by rDNA sequence variation. *Genetic Resources and Crop Evolution*, vol. 54, n. 3, p. 483-495. <https://doi.org/10.1007/s10722-006-9199-9>
- Sonnante, G.; Pignone, D. & Hammer K. (2007b) – The domestication of artichoke and cardoon: from Roman times to the genomic age. *Annals of Botany*, vol. 100, n. 5, p. 1095-1100. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm127>
- Verissimo, P.; Esteves, C.; Faro, C. & Pires, E. (1995) – The vegetable rennet of *Cynara cardunculus* L. contains two proteinases with chymosin and pepsin-like specificities. *Biotechnology Letters*, vol. 17, n. 6, p. 621-626. <https://doi.org/10.1007/BF00129389>
- Verissimo, P.; Faro, C.; Moir, A.J.; Lin, Y, Tang, J. & Pires, E. (1996) – Purification, Characterization and Partial Amino Acid Sequencing of Two New Aspartic Proteinases from Fresh Flowers of *Cynara cardunculus* L. *European Journal of Biochemistry*, vol. 235, n. 3, p. 762-768. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.00762.x>
- Vieira, M.; Pissarra, J.; Verissimo, P.; Castanheira, P.; Costa, Y.; Pires, E.; & Faro, C. (2001) – Molecular cloning and characterization of cDNA encoding cardosin B, an aspartic proteinase accumulating extracellularly in the transmitting tissue of *Cynara cardunculus* L. *Plant Molecular Biology*, vol. 45, n. 5, p. 529-539. <http://doi.org/10.1023/A:1010675015318>
- Walstra, P. (1993) -The Syneresis of Curd. In: Fox P.F. (Ed.) – *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Springer US, Boston, MA, pp 141-191. http://doi.org/10.1007/978-1-4615-2650-6_5
- Waugh, D.F. & Von Hippel, P.H. (1956) – κ -Casein and the Stabilization of Casein Micelles. *Journal of the American Chemical Society*, vol. 78, n. 18, p. 4576-4582. <https://doi.org/10.1021/ja01599a017>
- White, P.C.; Cordeiro, M.C.; Arnold, D.; Brodelius, P.E. & Kay, J. (1999) – Processing, activity, and inhibition of recombinant cyprosin, an aspartic proteinase from cardoon (*Cynara cardunculus*). *Journal of Biochemical Chemistry*, vol. 274, p. 16685-16693. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.24.16685>
- Wiklund, A. (1992) – The genus *Cynara* L. (Asteraceae-Cardueae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, vol. 109, n. 1, p. 75-123. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1992.tb00260.x>